

ГЕТЕРОСУБТИПИЧЕСКИЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ЗАЩИТА ОТ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА А (H5N1) У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННЫМ ВИРУСОМ ГРИППА А/ЛЕНИНГРАД/134/17/57(H2N2)

Рекстин А.Р., Дешева Ю.А., Лу Х.*, Александрова Г.И.,
Климов А.И. *, Кац Д.М. *, Руденко Л.Г.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия;

* Центр по контролю за заболеваемостью, Атланта, США

Резюме. При изучении эффективности нового холодоадаптированного реассортантного штамма H5N2, кандидата в вакцинные штаммы, в отношении защиты от высоковирулентного вируса гриппа H5N1 на мышинной модели, была отмечена определенная степень перекрестной защиты после прививки самим донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Лен/17 са) (H2N2). Выживаемость животных, иммунизированных интраназально (и/н) в высокой дозе холодоадаптированным вирусом Лен/17 са составила 80% после интраназального заражения А/Гонконг/483/97 (Гк/483) (H5N1), проведенного через восемь недель после иммунизации. В то же время смертность среди контрольных животных, не подвергнутых вакцинации, составляла 100%. Изучены механизмы перекрестного иммунного ответа, которые могли объяснить выживание мышей после летальной инфекции Гк/483. Сыворотки от мышей иммунизированных и/н Лен/17 са не реагировали с вирусом H5N1 в реакциях нейтрализации и гемагглютинации. В то же время в сыворотках и бронхолаважной жидкости были обнаружены IgG и IgA антитела, которые реагировали в иммуноферментном анализе с гемагглютинином и нейраминидазой вирусов H5N1 1997 года выделения. Спленоциты мышей, иммунизированных и/н Лен/17 са продуцировали IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 и IFN γ после стимуляции *in vitro* инактивированным вирусом H5N1. Наши данные указывают на то, что перекрестный гуморальный и клеточный иммунитет, индуцируемый Лен/17 са может играть роль в выздоровлении после летальной H5N1 инфекции. Изучение механизмов гетеросубтипического иммунитета может помочь созданию новых вакцин против высоковирулентных штаммов вирусов гриппа птиц.

Ключевые слова: гетеросубтипический иммунный ответ, живая гриппозная вакцина, вирусы гриппа птиц, пандемическая подготовка.

Rekstin A.R., Desheva J.A., Lu X., Alexandrova G.I., Klimov A.I., Katz J.M., Rudenko L.G.

HETEROSUBTYPIC IMMUNE RESPONSE AND CROSS-PROTECTION AGAINST A HIGHLY PATHOGENIC A (H5N1) INFLUENZA VIRUS IN MICE IMMUNIZED WITH COLD-ADAPTED A/LENINGRAD/134/17/57 (H2N2) INFLUENZA VIRUS

Abstract. While investigating the efficacy of an H5N2 ca reassortant vaccine candidate in protecting against a lethal challenge with a highly pathogenic (HP) H5N1 virus in the mouse model, we observed a degree of cross-

Адрес для переписки:

Рекстин Андрей Роальдович,
197376, Санкт-Петербург, ул.Акад.Павлова, д.12,
ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН.
Тел.: (812)-234-42-92, факс (812)-234-94-89.
E-mail: vaccine@mail.ru

protection provided by the ca Len/17 (H2N2) virus itself. 80% of mice administered a high dose of attenuated Len/17 vaccine intranasally (i.n.) survived after a lethal challenge with A/Hong Kong/483/97 H5N1 virus. Therefore, we investigated the basis of the cross-reactive immunity between H2N2 and H5N1 viruses that may have contributed to recovery from lethal HK/

483 virus infection. Sera from mice immunized i.n. with Len/17 did not cross-react with HK/483 virus in neutralization or hemagglutination-inhibition assays, however IgG and IgA antibodies that cross-reacted with the hemagglutinin and neuraminidase of H5N1 1997 viruses were detected. Spleen cells from mice immunized i.n. with Len/17 vaccine showed enhanced production of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, and IFN γ following in vitro stimulation with inactivated H5N1 virus. Our findings indicate that both cross-reactive humoral and cellular immunity induced by Len/17 H2N2 vaccine may play a role in recovery from lethal H5N1 virus infection. A better understanding of the mechanisms of heterosubtypic immunity will improve vaccine design against HP avian influenza viruses. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 5-6, pp 503-510)

Введение

Высокопатогенные вирусы птичьего гриппа продолжают вызывать серьезное беспокойство с тех пор, как первые случаи тяжелого заболевания человека птичьим гриппом А(Н5N1) со смертельным исходом были зарегистрированы в Гонконге в 1997 году [21]. В настоящее время создание безопасной и эффективной гриппозной вакцины для людей против высокопатогенных А(Н5N1) вирусов является одним из приоритетов Всемирной Организации Здравоохранения и национальных Центров по контролю за гриппом. Для решения этой задачи были применены различные подходы, включая получение реассортантных вакцинных штаммов с генетически модифицированным гемагглютинином в составе живого или инактивированного донорского штамма, или использование антигенно близкого непатогенного вируса для производства инактивированной вакцины [7, 11, 17, 18, 20, 22]. Было показано, что живые гриппозные вакцины имеют ряд преимуществ в профилактике гриппа, так как обеспечивают более широкую и эффективную защиту, вероятно благодаря их способности формировать сбалансированный гуморальный и клеточный иммунный ответ [1, 2]. Живые гриппозные вакцины используются в России достаточно давно, безвредны даже для маленьких детей и высоко эффективны при вакцинации различных возрастных групп населения: детей, взрослых и престарелых лиц [14, 15]. Недавно было сообщено ещё об одном новом подходе к созданию живых вакцин против пандемически опасных вариантов вирусов гриппа. Был получен холодоадаптированный (ca-cold-adapted) реассортантный штамм, содержащий ген гемагглютинина от непатогенного вируса гриппа птиц А(Н5N2), а остальные гены от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [4].

В процессе изучения эффективности указанного А(Н5N2) реассортанта – кандидата в вакцинные штаммы – на мышинной модели против летальной инфекции высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N1) наблюдалась определенная степень перекрестной защиты, формируемая после прививки самим донорским штаммом.

Целью настоящего исследования являлось изучение эффективности перекрестной защиты и гетеросубтипического иммунного ответа у мышей после иммунизации холодоадаптированным вирусом гриппа А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) к высокопато-

генному птичьему вирусу гриппа А/Гонконг/483/97 (H5N1).

Материалы и методы

Вирусы. В работе были использованы следующие вирусы гриппа: эпидемический вирус А/Ленинград/134/57 (H2N2) (Лен/wt) (wt-wild-type), холодоадаптированный А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Лен/17са); апатогенный вирус А/утка/Потсдам/1402-6/86 (H5N2) (H5N2/wt) и высокопатогенные вирусы гриппа А(Н5N1): А/Гонконг/483/97 (ГК/483), А/Гонконг/156/97 (ГК/156) и А/Гонконг/213/03 (ГК/213). Вирусы выращивали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов при 34°C (для вирусов серотипа А(H2N2)) или при 37°C (для вирусов серотипов А(H5N2) и А(H5N1)). Вирусосодержащие аллантоисные жидкости собирали спустя 26 (вирусы H5) или 48 часов (H2N2 вирусы). Инфекционные аллантоисные жидкости замораживали при -70°C. Пятидесяти процентную эмбриональную инфекционную дозу (ЭИД₅₀) определяли путем титрования десятикратных разведений вирусов на куриных эмбрионах с последующим подсчетом результатов по методу Рида и Минча [12].

Животные и иммунизация. Для всех экспериментов использовали самок линейных мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель. Мышей иммунизировали интраназально по 50 мкл на мышью под легкой анестезией в дозе 10⁷, 10⁶ ЭИД₅₀. Контрольные животные получали по 50 мкл фосфатно-солевого буфера интраназально. На третий и пятый день после заражения вирусами А(H2N2) у трех мышей из группы получали гомогенаты легких и носовых ходов. Инфекционную активность вирусов в образцах определяли путем титрования на куриных эмбрионах [9]. Каждый образец титровали отдельно. Титр вируса выражали как среднее арифметическое log₁₀ ЭИД₅₀/мл $\pm$ стандартное отклонение.

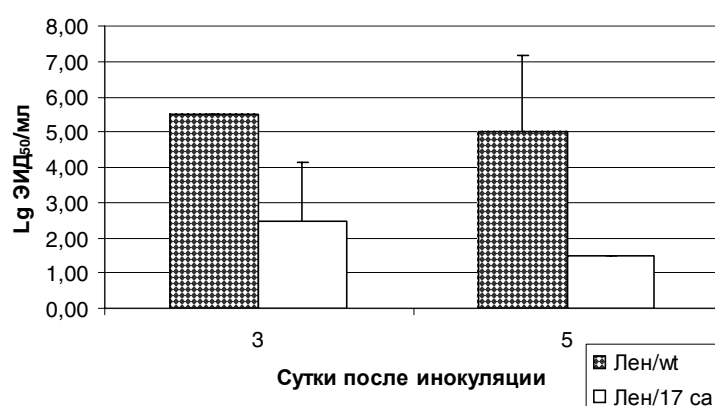
Экспериментальная инфекция. Через восемь недель после иммунизации мышам вводили под легкой анестезией 50 мкл фосфатно-солевого буфера, содержащего 10 мышинных 50% летальных доз (LD₅₀) вируса А/Гонконг/483/97 (H5N1). В течение 14 дней после инфицирования у животных проводили учет смертности и потери веса.

Серологические методы. Через четыре и шесть недель после иммунизации у мышей получали сы-

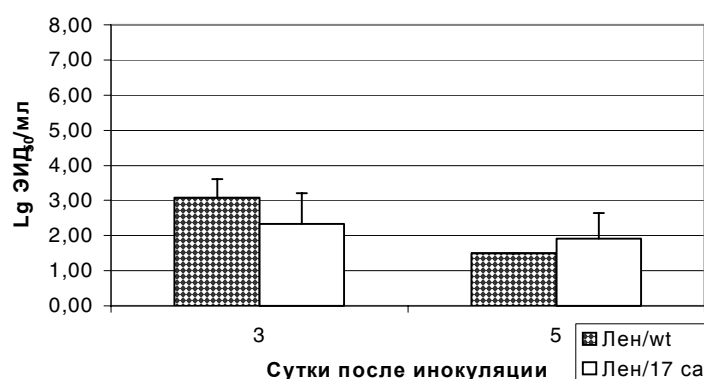
воротки и смывы нижних дыхательных путей [5]. Сыворотки прогревали 1 час при 56°C и обрабатывали экстрактом нейраминидазы авирулентного штамма холерного вибриона (Denka-Seiken, Co, Япония) для удаления термолабильных и термостабильных ингибиторов гемагглютинации. Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили с использованием 4 ГАЕ вирусов и 0,5% суспензии эритроцитов индюка [6]. IgG и IgA антитела в сыворотках и смывах нижних дыхательных путей определяли в реакции твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА), как описано ранее [5], за исключением того, что для сорбции использовали 1мкг/мл рекомбинантного гемагглютинина H5 ГК/156 или рекомбинантной нейраминидазы N1 ГК/483 (Protein Sciences Co., США). Титр антител выражали в десятичных логарифмах величины обратной наибольшему разведению образца, оптическая плотность которого при длине волны 490 нм превышала среднюю оптическую плотность в контрольных образцах бо-

лее чем на три стандартных отклонения. Титр нейтрализующих антител определяли в тесте микронейтрализации, как описано ранее [13] и выражали как обратное наибольшему разведению образца, дающего 50% нейтрализации ста 50% тканевых цитопатических инфекционных доз (ТЦИД₅₀) вируса.

Определение цитокинов. Спустя шесть недель после иммунизации, у пяти мышей из каждой группы были получены суспензии клеток селезенки. 5×10^6 /мл спленоцитов стимулировали либо инактивированным формалином цельновирионным ГК/213 в дозе 5 гемагглютинирующих единиц, либо рекомбинантным гемагглютинином ГК/156 в дозе 250 нг. Надосадочные жидкости собирали после 5 дней культивирования и замораживали при -70°C. Интерлейкин 2 (IL-2), интерферон-γ (IFN-γ), интерлейкин-5 (IL-5) и интерлейкин-10 (IL-10) определяли в образцах с помощью тест-систем Bio-Plex и оборудования Bio-Rad Laboratories (США) в соответствии с инструкциями производителя.



А



Б

Рис. 1. Репродукция эпидемического и холодоадаптированного вирусов гриппа А(H2N2) в респираторном тракте мышей: А) в верхних отделах; Б) в нижних отделах. Гомогенаты легких и носовых ходов получены от трех мышей из группы. Представлены средние величины инфекционной активности вирусов ± стандартное отклонение. Предел чувствительности метода $10^{1.5}$ ЭИД₅₀/мл.

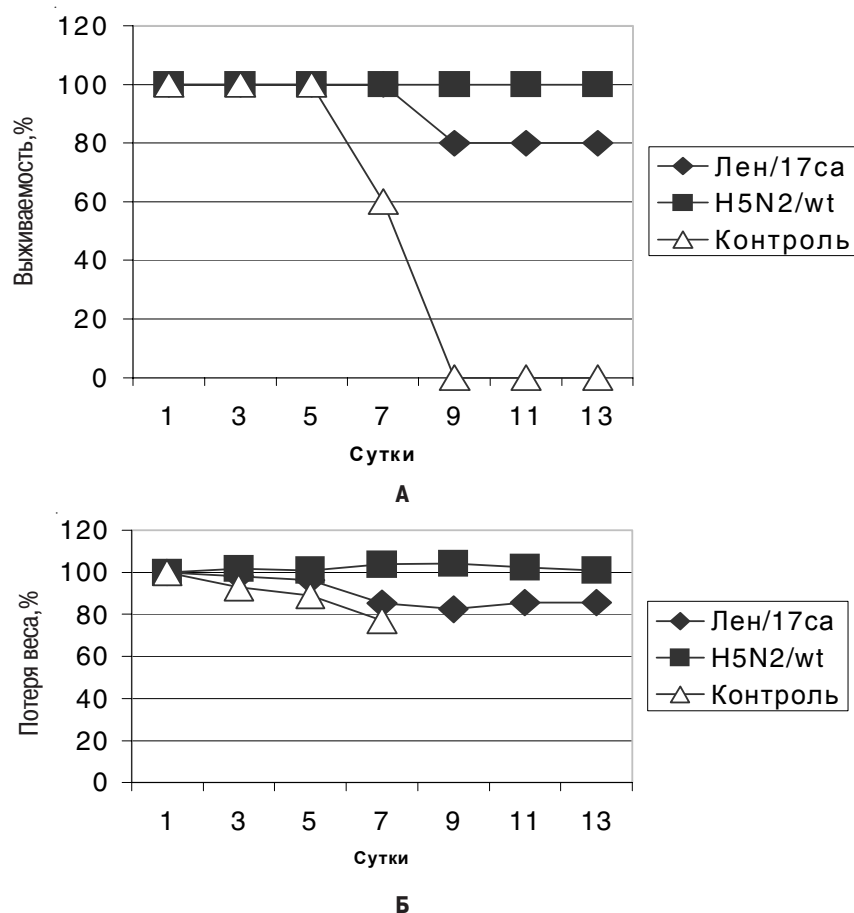


Рис.2. Выживаемость (А) и снижение веса (Б) у мышей после интраназального заражения 10 ЛД₅₀ А/Гонконг/483/97 (H5N1). Группы из пяти животных наблюдали в течение 14 дней.

Результаты

Репродукция вирусов А/Ленинград/134/57 (H2N2)-wt и А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)-са в респираторном тракте мышей. Уровни репродукции вирусов в верхнем и нижнем отделах респираторного тракта мышей представлены на рис.1. Репродукция вирусов зависела от свойств вируса, заражающей дозы и времени после заражения. Эпидемический вирус Лен/wt активно и более длительное время (до 5 суток после инфекции) репродуцировался в легких мышей до уровней 4,5-6,0 lgЭИД₅₀/мл. Репродукция температурочувствительного холодаадаптированного вируса Лен/17са в легких мышей была значительно ниже по сравнению с уровнями репродукции дикого вируса и на 3, и на 5 сутки после интраназальной иммунизации. Этот факт объясняется сниженной способностью вируса Лен/17са к росту при повышенных температурах в легких мышей. Напротив, в верхних дыхательных путях (носовых ходах) вирус Лен/17са репродуцировался в одинаковой степени с эпидемическим вирусом.

Защита против летальной инфекции вирусом гриппа А(H5N1). Спустя 8 недель после иммунизации, мышам вводили интраназально высокопатоген-

ный вирус гриппа А/Гонконг/483/97 (H5N1) в дозе 10 ЛД₅₀. На рис.2 представлены выживаемость и потери веса животных в течение 14 суток после летальной инфекции. Несмотря на то, что мыши, иммунизированные Лен/17са демонстрировали определенное снижение веса, 80 % животных были защищены от смертельной инфекции и выживали. Напротив, все неиммунизированные контрольные животные погибали к 8 суткам после экспериментальной инфекции, в то время как интраназальное введение апатогенного вируса H5N2/wt полностью защищало животных от инфекции и смерти от ГК/483 (H5N1).

Системный и местный гуморальный иммунный ответ. Для изучения механизма защитного эффекта, обеспечиваемого прививкой Лен/17са, был принят анализ формируемого гуморального ответа по сравнению с иммунизацией H5N2/wt (Табл.1). Несмотря на то, что интраназальная иммунизация мышей Лен/17са индуцировала значительные уровни нейтрализующих антител к гомологичному вирусу, перекрестно-реагирующих антител к вирусам H5N1 в РТГА и реакции нейтрализации у этой группы животных выявлено не было. В то же время им-

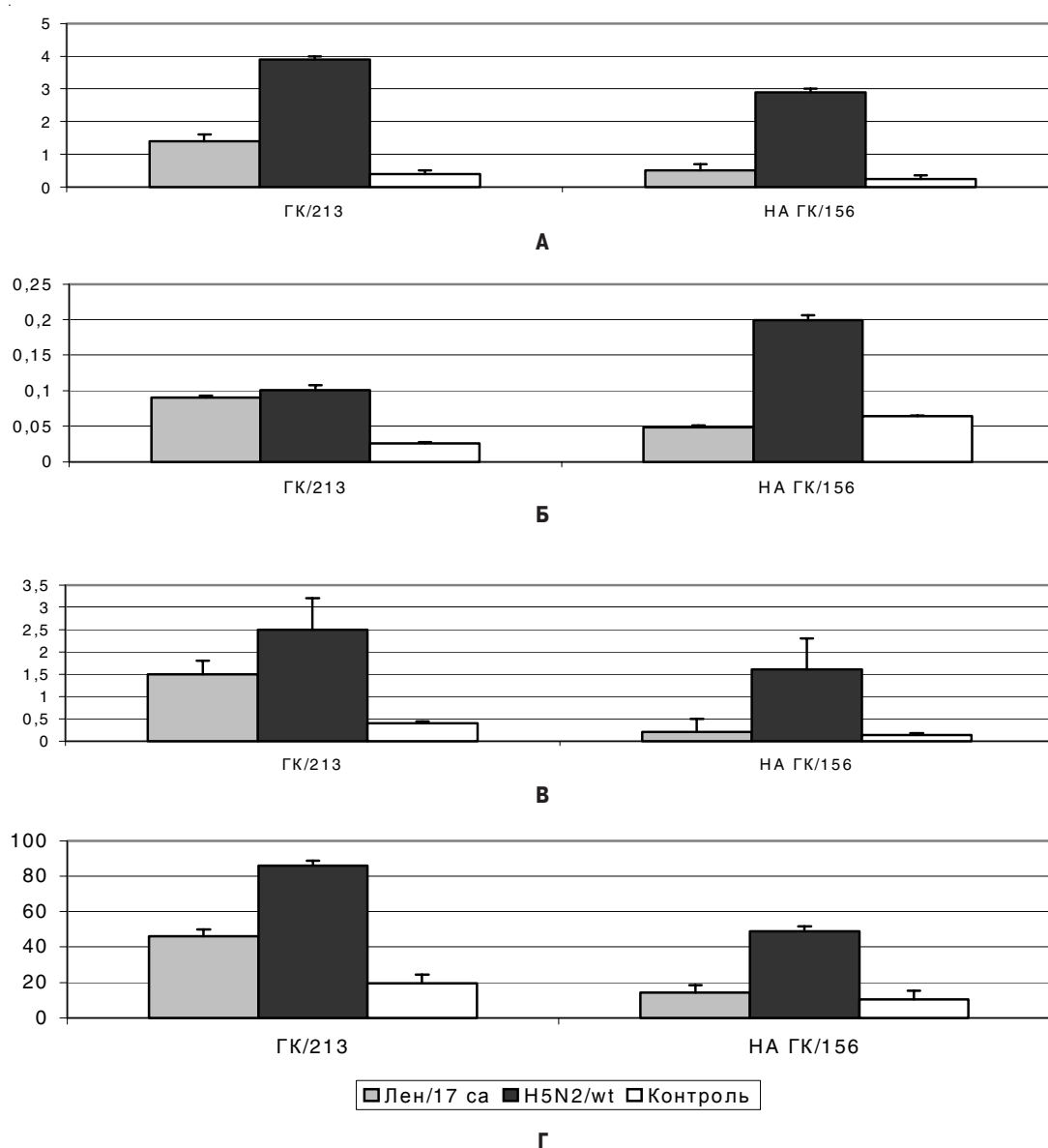


Рис.3. Продукция цитокинов (нг/мл) *in vitro* спленоцитами, стимулированными вирусами гриппа А(H5N1).
 А) IL-2, Б) IL-5, В) IL-10, Г) IFN γ .

Табл. 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРЕКРЕСТНО РЕАГИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСАМ ГРИППА А(H2N2) И А(H5N1)

Группа	Сыворотки *								Смывы нижних дыхательных путей	
	Лен/17са		ГК/156		rHA**		rNA***		rHA	
	РТГА	Нейтр.	РТГА	Нейтр.	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA
Лен/17са	12	120	<10	<30	2,8	2,7	2,6	2,1	1,2	0,5
H5N2/wt	<10	<30	16	480	5,4	4,0	3,1	<2	3,4	2,2
Контроль	<10	<30	<10	<30	<2	<2	<2	<2	<0,3	<0,3

* В реакции торможения гемагглютинации и ИФА результаты представлены как средний титр в группе из пяти мышей. В реакции нейтрализации тестировали объединенные сыворотки от пяти мышей из каждой группы.

** рекомбинантный гемагглютинин H5 ГК/156.

*** рекомбинантная нейраминидаза N1 ГК/483

мунизация мышей H5N2/wt индуцировала нейтрализующие антитела, которые реагировали с высокопатогенным H5N1 вирусом. Для дальнейшего изучения гуморального иммунного ответа, индуцируемого Лен/17са сыворотки и бронхолаважные смывы были изучены на наличие специфических IgG и IgA антител к рекомбинантным гемагглютинуину H5 и нейраминидазе N1 в иммуноферментном анализе (ИФА). Как следует из данных табл.1, специфические IgG и IgA к гемагглютинуину H5 были обнаружены в сыворотках мышей, иммунизированных Лен/17са, но в 400 и, соответственно, 20 раз меньших титрах, по сравнению с титрами, обнаруженными в сыворотках мышей, получивших H5N2/wt вирус. Специфические IgG, но не IgA антитела, к нейраминидазе N1 были также обнаружены у мышей, привитых как Лен/17са, так и H5N2/wt.

Вирусиндуцированная продукция цитокинов. Для оценки клеточного иммунного ответа, формируемого иммунизацией вирусами Лен/17са и H5N2/wt, была изучена продукция цитокинов спленоцитами мышей после рестимуляции вирусными антигенами *in vitro*. Клетки мышей, иммунизированных Лен/17са продуцировали значительные количества IL-2, IFN- γ , IL-5 и IL-10 после стимуляции *in vitro* инактивированным цельновирионным А/Гонконг/213/03 (H5N1), но в меньшей степени, чем лимфоциты мышей, получивших вирус H5N2/wt (Рис.3). Напротив, стимуляция тех же популяций лимфоцитов очищенным гемагглютинином H5 ГК/156 не вызывала заметного увеличения продукции указанных цитокинов у мышей, иммунизированных Лен/17са, в то время как клетки мышей, иммунизированных H5N2/wt отвечали значительной продукцией цитокинов. Эти данные указывают на то, что иммунизация мышей холодадаптированным вирусом Лен/17са вызывала стимуляцию Т-лимфоцитов, перекрестнореагирующих на эпитопы, присутствующие в целом вирионе, а не в очищенном гемагглютине H5.

Обсуждение

Заражение одним подтипом вируса гриппа А может вызывать частичную защиту против последующей инфекции вирусом другого подтипа. Это явление носит название гетеросубтипического или перекрестного иммунного ответа [3, 8]. У животных проявления гетеросубтипического иммунитета включают снижение титров инфекционного вируса в легких после экспериментальной инфекции, уменьшение тяжести инфекции и сокращение длительности выделения инфекционного вируса. Гетеросубтипический иммунный ответ связывают, с одной стороны, с продукцией секреторных IgA в респираторном тракте, а с другой стороны, со стимуляцией CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, которые могут рас-

познавать специфические эпитопы, общие для большинства вирусов гриппа А, внутренних белков вириона, таких как нуклеопротеин и матриксный белок [10, 19, 23, 24].

Отмечено, что иммунитет, формируемый после естественной инфекции, характеризуется большей перекрестной реактивностью и перекрестной защитой против вирусов одного подтипа, или же других подтипов, по сравнению с иммунитетом, формируемым после вакцинации [15, 21]. Применяемые в настоящее время для профилактики гриппа инактивированные вакцины, предназначенные для внутримышечного введения, индуцируют значительные уровни сывороточных антител, при минимальных изменениях местного мукозального иммунитета, и, таким образом, не предотвращают первоначальную репродукцию вируса в респираторном тракте. В экспериментах на животных показано, что инактивированные вакцины могут стимулировать гетеросубтипический иммунный ответ, в том числе против пандемически опасных вирусов гриппа, при условии интраназального пути введения и при применении различных адъювантов [19, 20].

Живые аттенуированные гриппозные вакцины представляют альтернативный и потенциально высокоэффективный способ стимуляции гетеросубтипического иммунного ответа, поскольку имитируют естественную инфекцию в верхних отделах респираторного тракта. Эндогенный путь презентации антигена при вакцинации живым вакцинным вирусом способствует сбалансированной стимуляции как CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, так и местного гуморального иммунного ответа.

В настоящем исследовании впервые была продемонстрирована перекрестная защита и гетеросубтипический иммунный ответ к высокопатогенному вирусу гриппа А/Гонконг/483/97 (H5N1) после интраназальной иммунизации мышей холодадаптированным аттенуированным вирусом А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Восемьдесят процентов животных, получивших прививку холодадаптированным вирусом были защищены от последующей смертельной инфекции 10 ЛД₅₀ А/Гонконг/483/97 (H5N1). Изучение механизмов гетеросубтипического иммунитета показало, что несмотря на то, что перекрестно-реагирующих антител в сыворотке к вирусу гриппа А(H5N1) в реакциях РТГА и нейтрализации выявлено не было, были обнаружены специфические антитела к гемагглютинуину и в меньшей степени к нейраминидазе в сыворотках и смывах нижнего респираторного тракта. Кроме того, интраназальная иммунизация мышей вирусом Лен/17са (H2N2) приводила к стимуляции перекрестно-реагирующих Т-лимфоцитов, выражающейся в продукции как Th1, так и Th2 цитокинов. Таким образом защита против летальной инфекции А(H5N1) была связана с перекрестно-реактивным гуморальным и клеточ-

ным иммунным ответом, сформировавшимся после прививки аттенуированным холодоадаптированным вирусом А/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

Список литературы

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа.- СПб, Наука, 1994.- 151с.
2. Belshe R.B., Mendelman P.M. Safety and efficacy of live attenuated, cold-adapted, influenza vaccine – trivalent// Immunol. Allergy Clin. North Am. – 2003. - Vol. 23.- P. 745-767.
3. Epstein S.L., Lo C., Misplon J.A., Lawson C.M., Hendrickson B.A., Max E.E., Subbarao K. Mechanisms of heterosubtypic immunity to lethal influenza A virus infection in fully immunocompetent, T cell depleted, β_2 -microglobulin-deficient, and J chain-deficient mice// J.Immunol. – 1997. - Vol.158. - P.1222-1230.
4. Desheva J.A., Rudenko L.G., Alexandrova G.I., Lu X., Rekstin A.R., Katz J.M., Cox N.J., Klimov A.I. Reassortment between avian apathogenic and human attenuated cold-adapted viruses as an approach for preparing influenza pandemic vaccines// Options for the Control of Influenza V/ International Congress Series 1263/ ed. Kawaoka Y. - 2004. - P.724-727.
5. Katz J.M., Lu X., Young S.A., Galphin J.C. Adjuvant activity of the heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* for oral administration of inactivated influenza virus vaccine// J.Infect.Dis. - 1997. - Vol.175. - P.352-363.
6. Kendal A.P., Skehel J.J., Pereira M.S. Concepts and procedures for laboratory based influenza surveillance/ ed. US Public Health Service, Atlanta, CDC. - 1982. - P.B17-35.
7. Li S., Liu C., Klimov A., Subbarao K., Perdue M.L., Mo D., Ji Y., Woods L., Hietala S., Bryant M. Recombinant influenza A virus vaccines for the pandemic human A/Hong Kong/97 (H5N1) viruses// J.Infec.Dis. – 1999. - Vol.179. – P. 1132-1138.
8. Liang S., Mozdzanowska K., Pallandino G., Gerhard W. Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice// J.Immunol. -1994. -Vol.152.- P.1653-1661.
9. Lu X., Tumpey T.M., Morken T., Zaki S.R., Katz J.M. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A(H5N1) viruses isolated from humans// J.Virol.-1999.- Vol.73.- P.5903-5911.
10. Nguyen H.H., Moldoveanu Z., Novak M.J. van Ginkel F.W., Ban E., Kiyono H., McGee J.R., Mestecky J. Heterosubtypic immunity to lethal influenza A virus infection is associated with virus-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte responses induced in mucosa-associated tissues// Virology. – 1999. - Vol. 254. - P.50-60.
11. Nicholson K.G., Colegate A.E., Podda A., Stephenson I., Wood J., Ypma E., Zambon M.C. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomized trial of two potential vaccines against H5N1 influenza// Lancet. - 2001.- Vol. 357.- P.1937-1943.
12. Reed L.J., Munch H.A. A simple method of estimating fifty percent endpoints// Am.J.Hyg. –1938. - Vol.27. - P.493-497.
13. Rowe T., Aberharthy A.A., Hu-Primmer J., Thompson W.W., Lu X.H., Lim W., Fukuda K., Cox N.J., Katz J.M. Detection of antibody to avian influenza A(H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays// J.Clin.Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P. 937-943.
14. Rudenko L.G., Arden N.H., Grigorieva E., Naychin A., Rekstin A., Klimov A.I., Donina S., Desheva J., Holman R.C., DeGuzman A., Cox N.J., Katz J.D. Immunogenicity and efficacy of Russian live attenuated and U.S. inactivated influenza vaccines used alone and in combination in nursing home residents// Vaccine.- 2001.- Vol.19.- P.308-318.
15. Rudenko L.G., Lonskaya N.I., Klimov A.I., Vasilieva R.I., Ramirez A. Clinical and epidemiological evaluation of live, cold-adapted influenza vaccine for 3-14 –years-olds// Bull.WHO. - 1996. - Vol.74.- P.77-84.
16. Schulman J.L., Kilbourne E.D. Induction of partial specific heterotypic immunity in mice by a single infection with influenza A virus// J.Bacteriol. - 1965. - Vol.89. -P.170.
17. Subbarao K., Chen H., Swayne D., Mingay L., Fodor E., Brownlee G., Xu X., Lu.X., Katz J., Cox N., Matsuoka Y. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics// Virology.- 2003.- Vol.305.- P. 192-200.
18. Takada A., Kuboki N., Okazaki K., Ninomiya A., Tanaka H., Itamura S., Nishimura H., Enami M., Tashiro M., Shortridge K.F., Kida H. Avirulent avian influenza virus as vaccine strain against a potential human pandemic// J.Virol. – 1999. - Vol. 73. - P.8303-8307.
19. Takada A., Matsushita S., Ninomiya A., Kawaoaka Y., Kida H. Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice// Vaccine. - 2003. - Vol.21. - P.3212-3218.
20. Tumpey T.M., Renshaw M., Clements J.D., Katz J.M. Mucosal delivery of inactivated influenza vaccine induces B-cell-dependent heterosubtypic cross-protection against lethal influenza A H5N1 virus infection// J.Virol. – 2001. - Vol.75. - P.5141-5150.
21. Webby R.J., Webster R.G. Are we ready for pandemic influenza?// Science.- 2004.- Vol.302.- P.1519-1522.
22. Webby R.J., Perez D.R., Coleman J.S., Guan Y., Knight J.H., Govorkova E.A., McClain-Moss

L.R., Peiris J.S., Rehg J.E., Tuomanen E.I., Webster R.G. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines // Lancet.- 2004.- Vol. 363.- P.1099-1103.

23. Webster R.G., Askonas B.A. Cross-protection and cross-reactive cytotoxic T cells induced by influen-

za virus vaccines in mice // Eur.J.Immunol. - 1980.- Vol.10. -P.396-401.

24. Yap K.L., Ada G.L. The recovery of mice from influenza A virus infection: adoptive transfer of immunity with influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognizing a common virion antigen // Scand. J.Immunol.- 1978.- Vol.8.- P.413-420.

поступила в редакцию 20.03.2005

принята к печати 07.04.2005