

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ОЦЕНКИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОЙ СЕКРЕЦИИ АНТИТЕЛ В-ЛИМФОЦИТАМИ *IN VITRO* ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИММУНОГЕННОСТИ В КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ РЕЗЕРВНЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН А (H5N1) И А (H5N2)

Лосев И.В.¹, Дони́на С.А.¹, Петухова Г.Д.¹, Ерофеева М.К.²,
Руденко Л.Г.¹, Найхин А.Н.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В мире накоплено достаточно данных о необходимости усовершенствования оценки иммуногенности гриппозных вакцин. В нашей стране для определения их иммуногенности регламентирован единственный тест – постановка реакции торможения геагглютинации (РТГА) с сыворотками крови вакцинированных лиц. Он далеко не полностью отражает поствакцинальные иммунные изменения в организме. Нами проведено изучение у волонтеров, ранее праймированных резервной живой гриппозной вакциной А (H5N2), иммуногенной активности инактивированной гриппозной вакцины (ИГВ), приготовленной из потенциально пандемического птичьего вируса гриппа А (H5N1) N1BRG-23. Сравнивали три метода: иммуноферментный анализ (ИФА) и РТГА с сыворотками крови (сывороточные антитела), и альтернативный подход, заключающийся в тестировании в ИФА антител, секретируемых В-клетками *in vitro* в надосадках культур мононуклеаров периферической крови (МПК) (секретируемые антитела). Показано значительное преимущество последнего метода в выявлении количества поствакцинальных конверсий IgA- и IgG-антител на раннем сроке после первой прививки (седьмой день). Эти данные позволили полностью оценить иммуногенность ИГВ H5N1, не прибегая к данным, полученным на более поздних сроках: 28-й день после первой прививки и 28-й день после второй прививки.

Вывод: испытанная методика определения в ИФА секреции антител *in vitro* может быть использована в качестве альтернативного теста для оценки иммуногенности гриппозных вакцин. Этот метод дает более точное представление о штаммоспецифическом гуморальном иммунном ответе.

Ключевые слова: вирус гриппа, определение иммуногенности, иммунный ответ, гуморальный, мононуклеарные клетки, периферическая кровь, супернатанты

Адрес для переписки:

Лосев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-42-92
E-mail: iemlosev@gmail.com

Address for correspondence:

Losev Igor V.
Research Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-42-92.
E-mail: iemlosev@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Лосев, С.А. Дони́на, Г.Д. Петухова,
М.К. Ерофеева, Л.Г. Руденко, А.Н. Найхин,
«Использование метода оценки поствакцинальной
секреции антител В-лимфоцитами *in vitro*
для характеристики иммуногенности в клинических
испытаниях резервных гриппозных вакцин А (H5N1)
и А (H5N2)» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18,
№ 2. С. 129–138. doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-129-138

© Лосев И.В. и соавт., 2016

For citation:

I.V. Losev, S.A. Donina, G.D. Petukhova, M.K. Erofeeva,
L.G. Rudenko, A.N. Naykhin, “Application of method based on
in vitro antibody quantification in PBMC supernatant samples
for immunogenicity evaluation of A (H5N1) and A (H5N2)
potentially pandemic influenza vaccines in clinical trials”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 2, pp. 129–138.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-129-138

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-129-138>

APPLICATION OF METHOD BASED ON *IN VITRO* ANTIBODY QUANTIFICATION IN PBMC SUPERNATANT SAMPLES FOR IMMUNOGENICITY EVALUATION OF A (H5N1) AND A (H5N2) POTENTIALLY PANDEMIC INFLUENZA VACCINES IN CLINICAL TRIALS

Losev I.V.^a, Donina S.A.^a, Petukhova G.D.^a, Erofeeva M.K.^b,
Rudenko L.G.^a, Naykhin A.N.^a

^a Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. There are many data worldwide which suggest that the methods for evaluation of influenza vaccines immunogenicity should be improved. The only method validated in Russia is a HAI (haemagglutination inhibition) assay with serum samples from vaccinated volunteers. This assay does not, however, completely reflect the vaccine-induced immunological changes. In this study, we evaluated antibody immune responses to A (H5N1) inactivated influenza vaccine boosting in healthy volunteers previously primed with A (H5N2) live attenuated influenza vaccine. We compared three methods of antibody detection: (i) HAI assay with serum samples; (ii) ELISA with serum samples; (iii) ELISA with PBMC (peripheral blood mononuclear cells) culture supernates, i.e., an alternative test based on quantification of antibodies secreted by PBMC *in vitro*. The latter test was shown to have an advantage over other techniques in IgA and IgG antibody detection at early timepoints (day 7) after vaccination. The first two methods allowed immunogenicity assessment at day 28 after vaccination.

Thus, a test based on antibody quantification in PBMC supernatant samples can be used as an alternative method for evaluation of influenza vaccines immunogenicity. This method also exhibits a better strain-specificity.

Keywords: influenza virus, immunogenicity, immune response, humoral, mononuclear cells, peripheral blood, supernates

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-15-00034.

Введение

В мире для профилактики гриппа успешно используются живые аттенуированные (ЖГВ) и инактивированные (ИГВ) вакцины. Протективность этих вакцин тесно связана с их иммуногенностью, то есть способностью стимулировать адаптивный иммунный ответ. Важным компонентом адаптивного противогриппозного иммунитета являются антитела сыворотки крови (сывороточные, циркулирующие антитела). Обычно количественные параметры поствакцинальной продукции данных антител тестируются в реакции торможения геагглютинации (РТГА), реакции микронейтрализации (РМН) и в иммуноферментном анализе (ИФА). ИФА обладает большей чувствительностью, дает возможность определять специфические иммуноглобулины

разных классов и подклассов, а также позволяет выявлять более широкий спектр антител. Показана связь уровня сывороточных антител, определяемых в ИФА, с защитой от гриппа [2, 6]. В то же время имеются и альтернативные данные об отсутствии или весьма слабом влиянии сывороточных антител на противогриппозную протекцию [16]. Существует способ определения антител не в сыворотках крови, а в насадках культур мононуклеаров периферической крови, то есть антител, секретируемых зрелыми В-лимфоцитами *in vitro* [9]. Этот подход апробирован при изучении поствакцинального иммунного ответа на прививку людей против столбняка [7], холеры [14], брюшного тифа [15]. Кроме того, он применен при оценке иммуногенности сезонной коммерческой тривалентной ИГВ [9].

В настоящей статье приведены сравнительные данные по оценке у волонтеров иммуногенности резервной моновалентной ИГВ, приготовленной из потенциально пандемического птичьего вируса А (H5N1). Эти волонтеры были привиты полтора года назад ЖГВ (H5N2). Сравнивали два методических подхода: определение сывороточных антител в ИФА и РТГА и детекция в ИФА антител, секретируемых В-клетками в надосадках культур МПК (далее – секретируемые антитела). Параллельно оценивали иммунный ответ после первой и повторной прививки к гомологичному вакцинному вирусу А (H5N1) и гетеросубтипичскому птичьему вирусу А (H5N2).

Материалы и методы

Вакцины

Волонтеры прививались парентерально дважды с интервалом в 28 дней субъединичной адсорбированной ИГВ «Orny flu». Вакцина изготовлена на основе штамма N1BRG-23 (H5N1). За полтора года до этого все волонтеры были дважды иммунизированы (праймированы) интраназально реассортантной ЖГВ «Ультрагривак», изготовленной на основе штамма A/17/turkey/Turkey/05/133 (H5N2).

Волонтеры

Испытание вакцин на волонтерах проведено в полном соответствии с национальным стандартом Российской Федерации (ГОСТ Р 52379-2005) «Надлежащая клиническая практика», отражающем международный этический и научный стандарт планирования и проведения исследований с участием человека (Good Clinical Practice; GCP).

ЖГВ H5N2 инокулировали стандартным коммерческим распылителем в обе ноздри по 0,5 мл в каждую. ИГВ H5N1 вводили парентерально. Сыворотки крови отбирали у волонтеров до вакцинации (Д0), через 7 дней после первой вакцинации (Д7), через 28 дней после первой вакцинации (Д28) и спустя 28 дней после повторной вакцинации (Д56). Эта схема давала возможность оценить иммунный ответ в отдельности на обе прививки.

В опыте участвовало 19 человек. Из них 12 (63%) были мужчинами и 7 (37%) – женщинами. Возраст колебался от 20 до 51 года. Среднее значение возраста составляло 30 лет.

Определение сывороточных антигемагглютинирующих антител (АТ) в реакции торможения геагглютинации (РТГА). РТГА выполняли по методике, рекомендованной ВОЗ [12].

Сыворотки крови обрабатывали RDE (receptor destroyed enzyme). Рабочая доза антигена – 4 АЕ. Использовали 1% взвесь лошадиных и человеческих эритроцитов 0(I) группы крови. Достоверными увеличениями (конверсиями) титров АТ считали их поствакцинальное повышение в 4 раза и более по отношению к довакцинальному уровню.

Иммуноферментный анализ (ИФА). IgA- и IgG-антитела в сыворотке крови и в надосадках культур лимфоцитов выявляли в ИФА по ранее описанной методике [1]. На планшете сорбировали 16АЕ вирусов, очищенных центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (30-60%). За титр сывороточных и локальных антител принимали наибольшее разведение исследуемого материала, при котором оптическая плотность (ОП) лунки с образцами превышала среднюю ОП в контрольных лунках (все ингредиенты реакции, не содержащие исследуемый материал) в 2 раза и более. За достоверный прирост титров антител в сыворотке крови и в СВДП принимали его увеличение в 4 раза и более.

Определение в ИФА антител, секретируемых культурами МПК, проводилось по методике He X.S. с соавторами [9]. Из крови волонтеров выделяли МПК в градиенте плотности, с использованием раствора «Histopaque». Полученные клетки культивировали в течение 4 дней при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂. По окончании инкубации собирали надосадки, которые очищали центрифугированием в течение 10 минут при 1500 оборотах в минуту. Полученные образцы замораживали при температуре -70 °С до исследования.

Статистическая обработка результатов. Использовали программное обеспечение Statistica и Graph Pod Prizm 5. Для сравнения данных применяли Wilcoxon Mathed Paire Test, Friaman ANOVA и Fisher exact (two-tailed).

Результаты

На рисунке 1 представлены данные о динамических изменениях у прививавшихся волонтеров средних геометрических титров (СГТ) изучаемых антител к вакцинному А (H5N1) и гетеросубтипичскому А(H5N2) вирусам.

Обнаружено, что иммунизация ИГВ H5N1 сопровождалась накоплением не только сывороточных, но и секретируемых антител к обоим вирусам. При этом имелось как сходство, так и отличие в продукции этих антител. Сход-

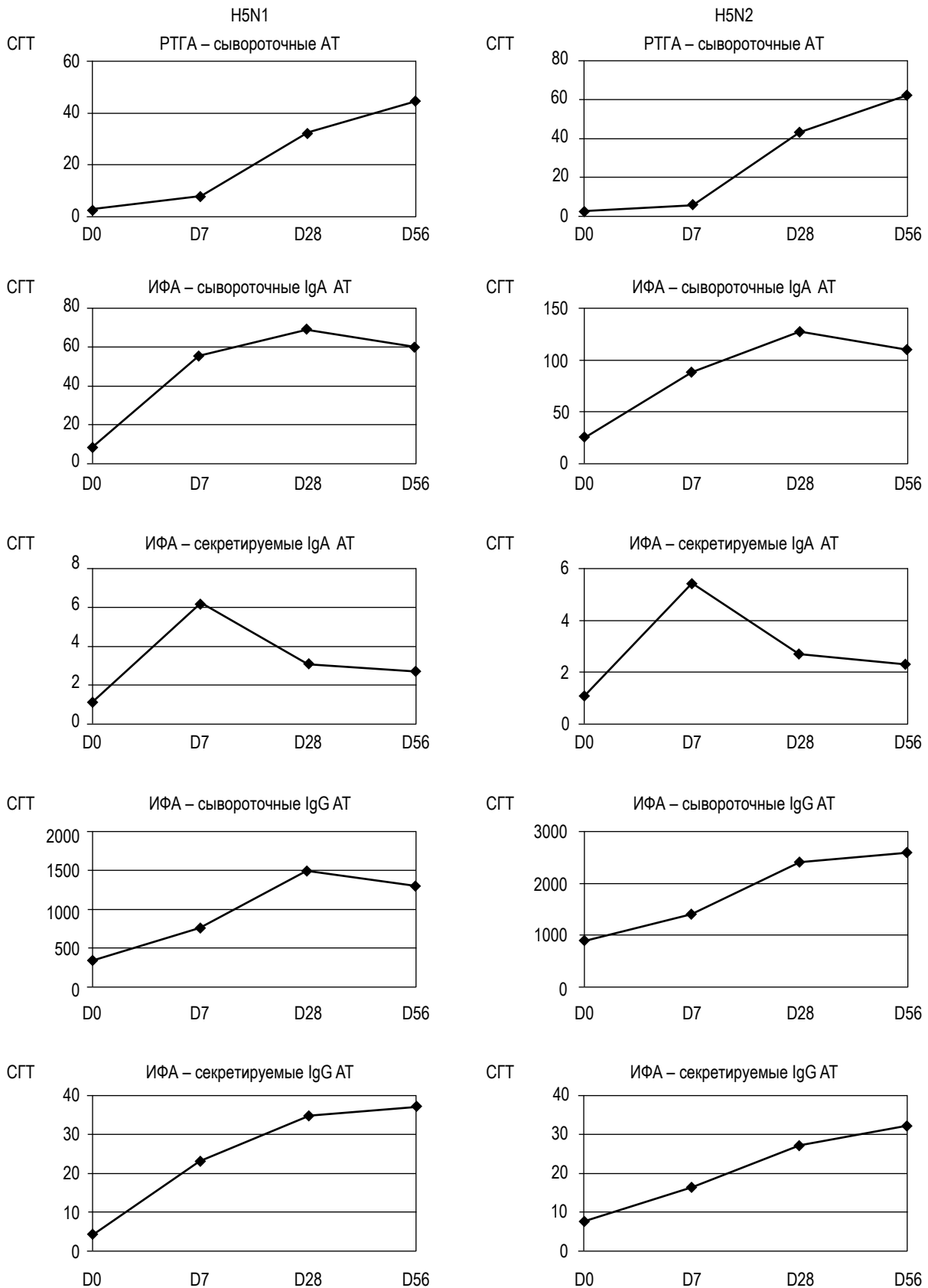


Рисунок 1. Средние геометрические титры (СГТ) антител (АТ) у волонтеров, привитых ИГВ Н5Н1

Примечание. D0 – до вакцинации; D7 – на 7 день после первой вакцинации; D28 – на 28 день после первой вакцинации, в день второй вакцинации; D56 – на 56 день после первой вакцинации и 28 день после второй вакцинации.

ТАБЛИЦА 1. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О НАЛИЧИИ КОНВЕРСИЙ АНТИТЕЛ У ВОЛОНТЕРОВ НА СЕДЬМОЙ ДЕНЬ ПОСЛЕ ПЕРВОЙ ПРИВИВКИ ИГВ H5N1

N волонтера в опыте	Конверсия антител (+)										Всего по всем тестам															
	РТГА		Надосадки культур МПК						Сыворотки крови																	
	Δ H5N1	Δ H5N2	A (H5N1)		A (H5N2)		A (H5N1) и/или A (H5N2)		A (H5N1) и/или A (H5N2)			A (H5N1) и/или A (H5N2)														
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
4			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
9																										
20			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
27																										
28			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
30			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
31			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
36			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
38			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
42			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
45			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
46																										
48																										
54																										
56																										
Итого 19 человек	5 (26%)	5 (26%)	14 (74%)	11 (58%)	16 (84%)	14 (74%)	9 (47%)	15 (79%)	14 (74%)	11 (58%)	16 (84%)	9 (47%)	10 (53%)	5 (26,3%)	10 (53%)	9 (47%)	5 (26,3%)	10 (53%)	3 (16%)	9 (47%)	5 (26,3%)	10 (53%)	12 (63%)	5 (26,3%)	13 (68%)	17 (90%)

ство проявлялось, во-первых, в том, что в обоих случаях СГТ IgG-антител были выше СГТ IgA-антител, во-вторых, динамика поствакцинального увеличения СГТ сывороточных и секретируемых IgG-антител имела сходный характер. Отличия включали следующие три параметра: (i) СГТ сывороточных IgA-антител значительно превосходили СГТ секретируемых антител того же класса; (ii) пиковое значение СГТ секретируемых IgA-антител наблюдалось на 7-й день после первой прививки, и в последующем их уровень снижался, несмотря на повторную иммунизацию. Пик же СГТ сывороточных IgA-антител отмечен позже — на 28-й день после первичной вакцинации, и после второй прививки их концентрация не менялась; (iii) в предвакцинальный период (Д0) СГТ сывороточных IgA-, и особенно IgG-антител был существенно выше СГТ секретируемых антител аналогичных классов ($p < 0,05$; $< 0,001$). Обращает на себя внимание также то, что перечисленные сходства и отличия относились в равной степени к данным с вакцинным вирусом А (H5N1) и гетеросубтипическим вирусом А(H5N2). Однако во всех временных интервалах СГТ сывороточных IgA- и IgG-антител к вирусу А (H5N2) имели более высокое значение ($p < 0,01$; $< 0,001$), тогда как уровень секретируемых антител обоих классов к гомологичному и гетерологичному вирусам существенно не отличался ($p > 0,05$)

Данные таблицы 1 отражают анализ изучаемого вопроса по другому показателю — числу (%) поствакцинальных конверсий сывороточных и секретируемых антител.

После двухкратной иммунизации (Д56) этот показатель в отношении секретируемых IgG-антител (ИФА) и сывороточных антигемагглютинирующих антител (РТГА) были весьма высоки: 74-84% конверсий. Несколько реже фиксировались конверсии сывороточных IgG-антител: 53-57% ($p < 0,05$). Показатели конверсий секретируемых IgA-антител составляли всего 26% ($p < 0,001$). Однако на раннем сроке после первичной вакцинации (Д7) наблюдалась иная ситуация. В этой точке наибольшее число конверсий зафиксировано в надосадках культур МПК (57-74%), тогда как аналогичный показатель для сывороточных антител составлял 16-47% ($p < 0,05$; $< 0,001$). Поэтому был проведен более детальный анализ иммуногенности ИГВ H5N1 по индивидуальным данным, полученным на раннем сроке антителогенеза (табл. 1).

В Д7 только 7 из 19 волонтеров (37%) ответили конверсиями сывороточных антигемагглютинирующих антител к вирусам гриппа А (H5N1) и/или А (H5N2), тогда как этот показатель в отношении секретируемых IgA- и/или IgG-антител составил 84% ($p < 0,001$). При этом у 8 из 19 человек (42%) отмечены конверсии только секретируемых антител при отсутствии таковых по данным РТГА. Иными словами, применение испытуемого теста значительно расширило сведения об индукции гуморального иммунного ответа на 7-й день после первой прививки. Причем общее количество конверсий секретируемых антител класса А и/или G в начальной (Д7) и конечной (Д56) точках исследования не отличались — соответственно, у 16 человек из 19 (84%) и у 16 человек из 19 (84%).

Таким образом, применение методики обнаружения антител в надосадках культур МПК не только обеспечивало дополнительную информацию по отношению к данным РТГА, но и давало возможность выявить уже на седьмой день после первичной вакцинации антителы и иммунный ответ у подавляющего числа вакцинированных лиц (84%).

Если сравнивать сведения в Д7 о поствакцинальных гуморальных иммунных ответах секретируемых и сывороточных IgA- и IgG-антител, то в этом случае первые превосходили по частоте вторые. Это касалось продукции IgA- и особенно IgG-антител к вирусам А(H5N1) и А(H5N2): по 74% конверсий секретируемых IgA-антител и по 47% конверсий сывороточных антител того же класса ($p < 0,05$); соответственно, 58 и 47% секретируемых и 26 и 16% сывороточных IgG-антител ($p < 0,01$). При этом присовокупление к данным *in vitro* (секретируемые антитела), результатов *in vivo* (сывороточные антитела) практически не увеличило число поствакцинальных конверсий (соответственно, 84 и 90%, $p > 0,05$).

Таким образом, в Д7 испытуемый тест имел преимущество в исследовании иммуногенности ИГВ H5N1 не только в РТГА, но и в ИФА — сывороточные антитела.

Обсуждение

Циркулирующие сывороточные и секретируемые антитела отличаются по качественному составу. Так, после введения вакцины различными путями наивные В-клетки и В-клетки памяти активируются в сайте аппликации препарата и в дренажных лимфатических узлах. Активированные клетки пролиферируют и дифференциру-

ются в плазмобласты в герминальных центрах локальных лимфоузлов. На 6–8 сутки после иммунизации большая часть плазмобластов покидают герминальные центры и уходят в циркуляцию в виде антиген-специфических антителосекретирующих В-клеток (АСК). В зависимости от антиген-презентирующих окружающих факторов они экспрессируют разные рецепторы траффика, которые и определяют их миграцию в те или иные регионы и ткани организма [10, 11]. Популяция клеток, мигрирующая в костный мозг, становится плазматическими клетками, секретирующими сывороточные антитела [4, 5]. Другие плазмобласты проникают в мукозальные сайты респираторного тракта и секретируют локальные антитела, принимающие прямое участие в нейтрализации возбудителя во входных воротах инфекции. Таким образом, исследование сыворотки крови дает представление о поствакцинальной продукции антител, секретирующихся только клетками костномозгового происхождения, тогда как В-клетки в культуре МПК секретируют *in vitro* все антитела вне зависимости от их ареала миграции. Кроме того, в данном случае выявляются антитела, проявляющие специфичность именно к вакцинному штамму, без учета воздействия количественных показателей иммунного ответа предшествующих штаммоспецифических и перекрестно-реагирующих антител к консервативным иммуно-эпитомам вируса [9].

Нами установлено, что даже однократное введение праймированным волонтерам ИГВ, приготовленной из птичьего вируса А (H5N1), то есть сероподтипа, с которым они ранее не контактировали, индуцировало продукцию не только сывороточных IgA- и IgG-антител, но и секретируемых *in vitro* антител тех же классов. При этом наблюдались количественно-качественные отличия. Первое из них – СГТ обоих изотипов секретируемых антител были существенно ниже по сравнению с СГТ сывороточных антител (рис. 1). Скорее всего, это можно связать с тем, что в системе *in vitro* фиксировались чисто штаммоспецифические иммуноглобулины без наслоения кросс-реактивных антител, выявляемых в ИФА при исследовании сывороток крови. Второе отличие касалось динамических изменений СГТ IgA-антител, пик которых в надосадках МПК наблюдался на раннем сроке после первой прививки (Д7), а в сыворотках крови – значительно позже (Д28). Аналогичная закономерность отмечена и американскими авторами при испытании сезонной ИГВ [8, 9]. Вполне веро-

ятно, что это объясняется той же причиной – выявление в двух сравниваемых тестах разных пулов IgA-антител, а именно: в случае с сывороточными антителами – преимущественно кросс-реактивных, а в системе *in vitro* – штаммоспецифических. При этом продукция кросс-реактивных сывороточных антител происходила по вторичному типу иммунного ответа, а секретируемых *in vitro* – по первичному, характеризующемуся более ранним накоплением IgA-антител по сравнению с IgG-антителами [4].

Обращает на себя внимание почти полная идентичность в динамике развития у волонтеров гуморального иммунного ответа к вакцинному вирусу А(H5N1) и гетеросубтипическому вирусу А(H5N2) – рисунок 1. Данный феномен можно интерпретировать по двум позициям. Первая из них – оба вируса имеют общий гемагглютинин H5, к которому продуцировались как сывороточные, так и секретируемые антитела. Вторая позиция – следует учитывать, что у людей, вакцинируемых ИГВ H5N1, формировалась В-клеточная иммунологическая память к вирусу А(H5N2) после предшествующей (1,5 года назад) вакцинации ЖГВ H5N2. Поэтому у участвовавших в нашем исследовании праймированных волонтеров интенсивность накопления сывороточных антител к праймирующему вирусу А (H5N2) оказалась выше, чем к вакцинному вирусу А (H5N1), с которым они встретились впервые. Необходимо отметить значительный бустированный эффект ИГВ H5N1 у праймированных ЖГВ H5N2 волонтеров, в отношении продукции сывороточных антител к вирусу H5N1, поскольку, как показано нами ранее, у непримированных волонтеров синтез этих антител, в ответ на двойную инокуляцию ИГВ H5N1, оказался весьма низким [13]. Однако количественные показатели (СГТ) секретируемых антител к обоим вирусам практически не отличались, поскольку, скорее всего, они проявляли специфичность только к общему гемагглютинину H5, без «наслоения» кросс-реактивных антител к консервативным белковым структурам вируса, выявляемым при исследовании в ИФА сывороточных антител. Данный феномен является еще одним доказательством качественного отличия секретируемых и сывороточных антител, выявляемых в ИФА.

На сегодняшний день иммуногенность гриппозных вакцин оценивается в единственном регламентированном тесте (РТГА) по числу поствакцинальных конверсий у привитых сывороточных антигемагглютинирующих ан-

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА КОНВЕРСИЙ АНТИТЕЛ У ВОЛОНТЕРОВ, ПРИВИТЫХ ИГВ Н5N1

Биологические материалы	Антитела	Число (%) поствакцинальных конверсий антител у волонтеров (N = 19)					
		Вакцинный вирус А (H5N1)			Гетеросубтипический праймирующий вирус А (H5N2)		
		II-I* (Д7)	III-I* (Д28)	IV-I* (Д56)	II-I* (Д7)	III-I* (Д28)	IV-I* (Д56)
Надосадки культур МПК	ИФА IgA	14 (73,7%)	8 (42,1%)	5 (26,3%)	14 (73,7%)	6 (31,6%)	5 (26,3%)
	ИФА IgG	11 (57,9%)	13 (68,4%)	16 (84,2%)	9 (47,4%)	11 (57,9%)	14 (73,7%)
Сыворотки крови	ИФА IgA	9 (47,4%)	15 (78,9%)	15 (78,9%)	9 (47,4%)	13 (68,4%)	13 (68,4%)
	ИФА IgG	5 (26,3%)	11 (57,9%)	11 (57,9%)	3 (15,8%)	9 (47,4%)	10 (52,5%)
	РТГА	5 (26,3%)	11 (57,9%)	14 (73,7%)	5 (26,3%)	14 (73,7%)	14 (73,7%)

Примечание. * II-I – через 7 дней после 1-й прививки (Д7); III-I – через 28 дней после 1-й прививки (Д28); IV-I – через 28 дней после 2-й прививки (Д56).

тител через 28-30 дней после вакцинации [12]. Однако такой подход далеко не полностью отражает способность вакцин (особенно живых) индуцировать адаптивный гуморальный иммунитет [2, 3, 9]. Поэтому почти все исследователи новых гриппозных вакцин, помимо РТГА, используют ИФА для определения сывороточных и локальных антител. В этой связи мы проанализировали в сравнительном плане частоту (%) конверсий сывороточных и секретируемых антител после вакцинации волонтеров ИГВ Н5N1.

Установлено (табл. 2), что двукратная прививка данной вакциной (Д56) индуцировала наибольшее число конверсий сывороточных IgA-антител и сывороточных антиагглютинирующих антител, более низкое – сывороточных IgG-антител и очень низкое – секретируемых IgA-антител. Однако на раннем сроке после первой прививки (табл. 1), наоборот, суммарное число конверсий секретируемых антител класса А и/или G оказалось самым высоким (84%), по сравнению с конверсиями сывороточных (68%) и особенно антиагглютинирующих антител (26%). В большей степени данное преимущество касалось выявления в ИФА секретируемых IgG-антител (58% конверсий), по сравнению с сывороточными IgG-антителами (16-26% конверсий). Но самое важное заключалось в том, что использование теста *in vitro* позволило составить полное представление об иммуногенности Н5N1 уже на седьмой день после первичной вакцинации (84% конверсий), поскольку в этом плане последующие исследования в более отдаленные интервалы (Д28

и Д56) практически не добавили информации (те же 84% конверсий).

Резюмируя, можно сделать следующие выводы.

При бустировании волонтеров ИГВ Н5N1 на фоне предшествовавшего праймирования ЖГВ Н5N2 показано, что ИГВ Н5N1 стимулировала продукцию не только сывороточных IgA- и IgG-антител, но и секрецию *in vitro* зрелыми В-клетками иммуноглобулинов тех же классов как к вакцинному А (H5N1), так и к гетеросубтипическому вирусу А (H5N2)

Поствакцинальный гуморальный иммунный ответ, фиксируемый в ИФА *in vitro*, отличается по ряду параметров от аналогичного ответа *in vivo*, то есть от данных определения в том же тесте сывороточных антител: более низкий уровень IgA- и IgG-антител, смещение пика секреции IgA-антител на ранний срок после первичной вакцинации. Все это в совокупности свидетельствует в пользу того, что *in vitro* выявляются преимущественно штаммоспецифические антитела, индуцированные непосредственно вакцинным вирусом, тогда как в тесте *in vivo* – главным образом, перекрестно-реагирующие сывороточные антитела к консервативным иммунодоминантным эпитопам вириона.

В сравнении с тестированием в РТГА и ИФА сывороточных антител испытанная методика имела преимущество в выявлении частоты поствакцинальных конверсий IgA- и особенно IgG-антител, констатируемых на раннем сроке после первичной вакцинации (7-й день). Эти данные позволили уже на этом этапе полностью оценить иммуногенность вакцины. Исследования в последующих временных интервалах (28 день после первой прививки и 28 день после второй

прививки) не дали дополнительной информации.

Перечисленное выше свидетельствует о возможности использования испытанной методики определения в ИФА секреции антител *in vitro* в качестве альтернативного приема оценки иммуногенности гриппозных вакцин, дающего более

точное и полное представление об антительном иммунном ответе непосредственно к штамму — индуктору антителогенеза.

Дополнительно выявлен бустирующий эффект в отношении продукции сывороточных антител к вакцинному вирусу А (H5N1) у людей, праймированных полтора года назад ЖГВ (H5N2).

Список литературы / References

1. Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Григорьева Е.П., Кузнецова С.А., Лосев И.В., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Локальный и гуморальный иммунный ответ у больных гриппом и у лиц, привитых против сезонных и пандемических вирусов гриппа А // Вопросы вирусологии, 2013. Т. 58, № 3. С. 37-42. [Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Grigorieva E.P., Kuznetsova S.A., Losev I.V., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Local Antibody Immune Responses in Influenza Patients and Persons Vaccinated with Seasonal, Pre-pandemic, and Pandemic Live Attenuated Influenza Vaccines. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, Vol. 58, no. 3, pp. 37-42. (In Russ.)]
2. Найхин А.Н., Артемьева С.А., Выборных Е.Н., Попова Т.Л., Каторгина Л.Г., Ким Т.Н., Кустикова Ю.Г., Денисов Г.М. Роль функциональной активности антител в защищенности людей от гриппа // Вопросы вирусологии, 1991. Т. 36, № 3. С. 194-197. [Naikhin A.N., Artemyeva S.A., Vybornykh E.N., Popova T.L., Katorgina L.G., Kim T.N., Kustikova Yu.G., Denisov G.M. The role of antibody functional activity in the protection of people against influenza. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1991, Vol. 36, no. 3, pp. 194-197. (In Russ.)]
3. Найхин А.Н. Гетеросубтипический иммунитет к вирусам гриппа А: эпидемиологические данные, вовлеченность разных иммунологических факторов, вакцинация // Вопросы вирусологии, 2012. Т. 57, № 3. С. 4-9. [Naikhin A.N. Heterosubtypic immunity to influenza A viruses: epidemiological data, involvement of different immunological factors, vaccination. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2012, Vol. 57, no. 3, pp. 4-9. (In Russ.)]
4. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: Гэотар Медиа, 2010. 749 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 749 p.
5. Benner R., Hijmans W., Haaijman J.J. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin. Exp. Immunol.*, 1981, Vol. 46, no. 1, pp. 1-8.
6. Cox R.J., Brokstad K.A., Zuckerman M.A., Wood J.M., Haaheim L.R., Oxford J.S. An early humoral immune response in peripheral blood following parenteral inactivated influenza vaccination. *Vaccine*, 1994, Vol. 12, no. 11, pp. 993-999.
7. Ershler W.B., Moore A.L., Hacker M.P. Specific *in vivo* and *in vitro* antibody response to tetanus toxoid immunization. *Clin. Exp. Immunol.*, 1982, Vol. 49, no. 3, pp. 552-558.
8. Ershler W.B., Coe C.L., Gravenstein S., Schultz K.T., Klopp R.G. Specific antibody synthesis *in vitro*. IV. The correlation of *in vitro* and *in vivo* antibody response to influenza vaccine in rhesus monkeys. *Clin. Exp. Immunol.*, 1988, Vol. 73, no. 3, pp. 355-3659.
9. He X.S., Sasaki S., Narvaez C.F. Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination. *Journal of Immunological Methods*, 2011, Vol. 365, pp. 67-75.
10. Kunkel E.J., Butcher E.C.. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity*, 2002, Vol. 16, no. 1, pp. 1-4.
11. Kunkel E.J., Butcher E.C. Plasma-cell homing. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, no. 10, pp. 822-829.
12. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J. Detection of antibody to avian influenza A(H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, Vol. 37, pp. 937-943.
13. Rudenko L., Naykhin A., Donina S. Assessment of immune responses to H5N1 inactivated influenza vaccine among individuals previously primed with H5N2 live attenuated influenza vaccine. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2015 [in print].
14. Qadri F., Ryan E.T., Faruque A.S., Ahmed F., Khan A.I., Islam M.M., Akramuzzaman S.M., Sack D.A., Calderwood S.B. Antigen-specific immunoglobulin A antibodies secreted from circulating B cells are an effective marker for recent local immune responses in patients with cholera: comparison to antibody-secreting cell responses and other immunological markers. *Infect. Immun.*, 2003, Vol. 71, no. 8, pp. 4808-4814.
15. Sheikh A., Bhuiyan M.S., Khanam F., Chowdhury F., Saha A., Ahmed D., Jamil K.M., LaRocque R.C., Harris J.B., Ahmad M.M., Charles R., Brooks W.A., Calderwood S.B., Cravioto A., Ryan E.T., Qadri F. Salmonella

enterica serovar Typhi-specific immunoglobulin A antibody responses in plasma and antibody in lymphocyte supernatant specimens in Bangladeshi patients with suspected typhoid fever. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2009, Vol. 16, no. 11, 1587-1594.

16. Treanor J., Wright P.F. Immune correlates of protection against influenza in the human challenge model. *Dev. Biol. (Basel)*, 2003, Vol. 115, pp. 97-104.

Авторы:

Лосев И.В. — научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Донина С.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Петухова Г.Д. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Ерофеева М.К. — д.м.н., заведующая лабораторией испытаний новых средств защиты от вирусных инфекций ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Руденко Л.Г. — д.м.н., профессор, руководитель отдела вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Найхин А.Н. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Losev I.V., Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Donina S.A., PhD (Medicine), Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Petukhova G.D., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Erofeeva M.K., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory for Trials of Novel Antiviral Remedies, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Rudenko L.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Naykhin A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 20.10.2015
Принята к печати 04.12.2015

Received 20.10.2015
Accepted 04.12.2015