

ИММУНОГЕННОСТЬ И ЗАЩИТНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЖИВОЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСОВ ГРИППА А (H5N1) ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИХ ДЛЯ ПРАЙМ-БУСТ ИММУНИЗАЦИИ МЫШЕЙ

И.В. Лосев, Г.Д. Петухова, И.Н. Исакова-Сивак, Л.Г. Руденко

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Случаи заболевания людей птичьими вирусами гриппа А (H5N1) характеризуются тяжелыми клиническими проявлениями и высоким уровнем летальности. Основная проблема вакцин H5N1 заключается в их низкой иммуногенности для людей. Прайм-буст иммунизация считается эффективным подходом к усилению иммуногенности вакцин. Целью данной работы было сравнение иммунного ответа и защитной эффективности при использовании следующих схем прайм-буст иммунизации мышей: 1) праймирование и бустирование живой гриппозной вакциной (ЖГВ) A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2); 2) праймирование ЖГВ A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) и бустирование инактивированной гриппозной вакциной (ИГВ) «Орни-флю» (H5N1). Оба способа характеризовались усилением продукции сывороточных антител к гомологичным и гетерологичным штаммам вируса гриппа А. Достоверное увеличение титров антител к гомологичному штамму по данным РТГА обнаруживалось только при двукратной вакцинации ЖГВ. Более чувствительный метод ИФА выявил достоверное увеличение титров специфичных к вирусу сывороточных IgG как при обоих способах прайм-буст иммунизации, так и при однократном введении мышам ЖГВ или ИГВ. Бустирование как ЖГВ, так и ИГВ достоверно повышало титры сывороточных IgG к другим генетическим линиям вирусов А (H5N1): в большей степени к гомологичному A/NIBRG-23 (clade 2.2), штамму A/Indonesia (clade 2.1) и в меньшей степени к более генетически удаленному A/Vietnam (clade 1), а также к гетерологичному A/New York (H1N1). Однократная вакцинация ЖГВ также вызывала достоверный прирост антител ко всем использованным вирусам, хотя количественно меньший, чем при любой прайм-буст иммунизации. По способности стимулировать специфичные к гомологичному штамму CD8⁺ Т-лимфоциты селезенки, оптимальной схемой оказалась прайм-буст иммунизация ЖГВ/ИГВ, которая привела к достоверному увеличению этих клеток по сравнению с контрольной группой, в отличие от всех остальных случаев. Обе бустлирующие вакцины (ЖГВ и ИГВ) показали высокий уровень защиты при летальном челлендже вирусом А (H1N1) и снижение титров вируса в легких по сравнению с отрицательным контролем. Оба способа прайм-буст иммунизации приводили к практически полному клиренсу вирусов А (H5N1) в легких и носовых ходах мышей, вне зависимости

Адрес для переписки:

Петухова Галина Дмитриевна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (921) 759-96-06 (моб.).
E-mail: gala.iem@gmail.com

Contacts:

Galina D. Petukhova
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Academic Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (921) 759-96-06 (mobile).
E-mail: gala.iem@gmail.com

Библиографическое описание:

Лосев И.В., Петухова Г.Д., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.
Иммуногенность и защитная эффективность живой
и инактивированной гриппозных вакцин против вирусов гриппа
А (H5N1) при использовании их для прайм-буст иммунизации мышей //
Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 67–75. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-1-67-75

Citation:

Losev I.V., Petukhova G.D., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G. Immunogenicity
and protective efficacy of prime-boost immunization in mice vaccinated
with live and inactivated influenza A (H5N1) vaccines // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 67–
75. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-67-75

от штамма. Полученные результаты свидетельствуют о формировании перекрестного иммунитета к вирусам А (H5N1), относящимся к различным кладам и о целесообразности прайм-буст вакцинации для формирования иммунитета к птичьим вирусам А (H5N1).

Ключевые слова: гриппозные вакцины, грипп, прайм-буст иммунизация, вакцинация, живая аттенуированная гриппозная вакцина, А (H5N2).

IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVE EFFICACY OF PRIME-BOOST IMMUNIZATION IN MICE VACCINATED WITH LIVE AND INACTIVATED INFLUENZA A (H5N1) VACCINES

Losev I.V., Petukhova G.D., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Avian influenza A (H1N1) in humans is characterized by severe clinical manifestation and high mortality. The main drawback of current human H5N1 vaccines is related to low immunogenicity. Prime-boost vaccination is considered as an effective approach to enhance vaccine immunogenicity. The aim of this study was to compare immune response and protective efficacy of diverse prime-boost immunization protocols: 1) prime and boost with live influenza vaccine (LAIV) A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2); 2) prime with LAIV A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) followed by boost with inactivated influenza vaccine (IIV) "Orniflu" (H5N1). Both vaccination protocols were found to increase serum antibody level against homologous and heterologous influenza A virus strains. In particular, serum HAI antibodies were significantly elevated solely after LAIV/LAIV vaccination. A more sensitive sandwich ELISA assay revealed that serum virus-specific IgG antibody levels were significantly increased after both vaccination protocols as well as after a single LAIV or IIV vaccination. Both LAIV and IIV boost increased titers of serum IgG specific against unrelated influenza A (H5N1) strains: homologous A/NIBRG-23 (clade 2.2), A/Indonesia (clade 2.1) and, to a lesser extent, against clade 1 virus A/Vietnam and even against heterologous A/New York (H1N1). Single LAIV vaccination was also able to induce antibody responses against all strains examined, though to a lesser degree as compared with either prime-boost protocols. However, amount of splenic CD8⁺ T cells specific to homologous influenza A virus strain was solely observed after LAIV/IIV vaccination. Moreover, both LAIV and IIV boosting effect demonstrated high protection level against lethal challenge with A (H1N1) WT virus and significantly decreased lung viral titer compared to control group. Furthermore, both regimens resulted in lung virus clearance after non-lethal challenge with clade 1, 2.1 or 2.2 influenza A (H5N1). In conclusion, we demonstrated that both LAIV/LAIV and LAIV/IIV regimens were able to induce cross-clade A (H5N1) response and that prime-boost immunization was a promising approach to improve immunogenicity of influenza A (H5N1) virus vaccine.

Key words: influenza vaccines, influenza, prime-boost immunization, vaccination, live attenuated influenza vaccine, influenza virus A (H5N2).

Введение

Высокопатогенные вирусы гриппа А (H5N1) циркулируют в популяции диких и домашних птиц с 1997 г. с периодическим инфицированием людей [1]. Случаи заболевания людей птичьими вирусами гриппа характеризовались тяжелыми клиническими проявлениями и высоким уровнем летальности [6]. Поскольку наиболее действенным методом борьбы с гриппозной инфекцией остается вакцинопрофилактика [23], ВОЗ было принято решение о создании резервных вакцин против всех потенциально пандемических вирусов гриппа птичьего, животного и человеческого происхождения [10]. В рамках этой программы разными коллективами авторов в мире был разработан ряд гриппозных вакцин, как живых, так и инактивированных, против вирусов гриппа птиц А (H5N1) [11]. В большинстве случаев, полученные вакцины были ареактогенны, но слабо иммуногенны [2]. Одним из перспективных подходов к усилению иммуногенности вакцин считается прайм-буст иммунизация, которая

приводит к быстрому и интенсивному накоплению сывороточных иммуноглобулинов в ответ на введение праймированным реципиентам гомологичных или гетерологичных вакцинных штаммов вируса гриппа А [21].

Сезонные живые аттенуированные гриппозные вакцины (ЖГВ) являются безопасным и эффективным средством профилактики гриппа в отношении как гомологичных, так и гетерологичных сезонных штаммов [3, 4, 19]. Однако клинические испытания потенциально пандемической ЖГВ А/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) на волонтерах показали ее невысокую иммуногенность после двукратного введения в отношении как гуморального, так и клеточного иммунного ответа [17]. В дальнейших исследованиях было установлено, что несмотря на сниженную по сравнению с сезонными штаммами иммуногенность, вакцинация формирует долговременную иммунологическую память, приводящую к усилению иммунного ответа на буст-иммунизацию инактивированной гриппозной вакциной (ИГВ) А (H5N1) [16, 18].

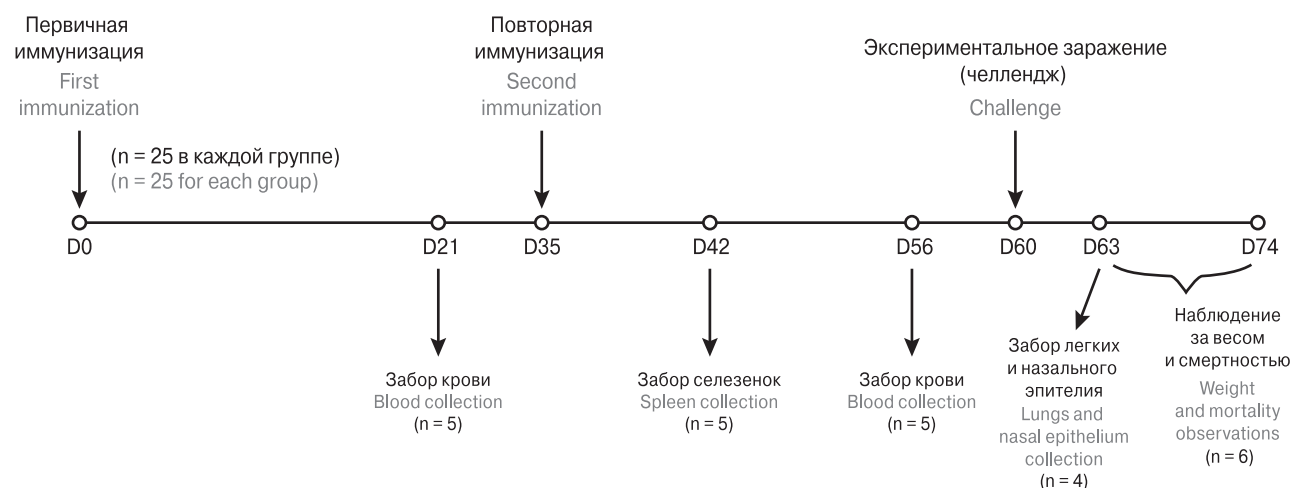


Рисунок 1. Схема исследования и характеристики вирусов

Figure 1. Study design and virus characteristics

Целью данной работы явилось сравнение иммунного ответа мышей при использовании следующих схем прайм-буст вакцинации: 1) праймирование и бустирование ЖГВ A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2); 2) праймирование ЖГВ A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) и бустирование ИГВ «Орнифлю» (H5N1); оценка защитного эффекта обеих схем при последующем экспериментальном заражении мышей гомологичными и гетерологичными штаммами вируса гриппа А.

Материалы и методы

Исследование проводили на самках мышей линии СВА. Животные были разделены на 5 групп по 35 мышей, каждой из которых была проведена первичная и повторная иммунизация с последующим экспериментальным заражением четырьмя различными штаммами вируса гриппа А. Для сравнения бустированного эффекта живой (ЖГВ) и инактивированной (ИГВ) гриппозных вакцин, в опытных группах 1 и 2 первичная иммунизация проводилась ЖГВ, а повторная иммунизация — либо ЖГВ (в группе 1), либо ИГВ (в группе 2). В контрольных группах 3, 4 и 5 один или оба препарата были заменены стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS). Праймирующую моновалентную ЖГВ A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) вводили интраназально в дозе 100 MID₅₀/50 мкл. Буст-иммунизацию проводили через 1 месяц после первичной иммунизации. ЖГВ вводили тем же способом; ИГВ «Орнифлю» (Микроген, Иркутск) вводили внутримышечно по 50 мкл (1,5 мкг гемагглютинаина). Еще через месяц после буст-вакцинации, каждая группа мышей была разделена на 4 подгруппы, которые были заражены следующими вирусами: А) A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) × PR8, clade 1 (по 4

мыши); Б) A/Indonesia/05/2005 (H5N1) × PR8, clade 2.1 (по 4 мыши) и В) A/NIBRG-23 (H5N1), clade 2.2 (по 4 мыши) (вирусы вводили в дозе 100 MID₅₀/50 мкл), а также Г) 10 LD₅₀/50 мкл эпидемического вируса A/New York/61/15 (H1N1) (по 8 мышей) [12]. Схема исследования представлена на рисунке 1; распределение животных по группам и характеристики вирусов — в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Экспериментальные группы

Table 1. Experimental groups

Группа Group	Первичная иммунизация First immunization	Повторная иммунизация Second immunization	Челлендж Challenge
1	ЖГВ* LAIV*	ЖГВ LAIV	H1N1 wt H5N1 (cl. 1) H5N1 (cl. 2,1) H5N1 (cl. 2,2)
2	ЖГВ LAIV	ИГВ** IIV	H1N1 wt H5N1 (cl. 1) H5N1 (cl. 2,1) H5N1 (cl. 2,2)
3	ЖГВ LAIV	PBS***	H1N1 wt H5N1 (cl. 1) H5N1 (cl. 2,1) H5N1 (cl. 2,2)
4	PBS	ИГВ IIV	H1N1 wt H5N1 (cl. 1) H5N1 (cl. 2,1) H5N1 (cl. 2,2)
5	PBS	PBS	H1N1 wt H5N1 (cl. 1) H5N1 (cl. 2,1) H5N1 (cl. 2,2)

Примечание. *ЖГВ — живая гриппозная вакцина;

**ИГВ — инактивированная гриппозная вакцина;

***PBS — фосфатно-солевой буфер.

Note. *LAIV — live attenuated influenza vaccine; **IIV — inactivated influenza vaccine; ***PBS — phosphate buffered saline.

Накопление вирусов гриппа проводили в аллантоисной полости 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов (ЗАО «Птицефабрика Синявинская», Кировский район, Ленинградская область) [5]. Вирус из вирусосодержащей жидкости выделяли при помощи ультрацентрифугирования с очисткой на градиенте сахарозы, и хранили при температуре -70°C до использования в экспериментах.

Инфекционную дозу живых вирусов гриппа подбирали путем определения их MID_{50} (mouse infectious dose 50%) на мышах той же линии (СВА) стандартным методом [13]. Для вируса A/New York/61/15 (H1N1) определяли также LD_{50} (lethal dose 50%) [13]. Инактивированную грип-

позную вакцину «Орнифлю» вводили внутримышечно в дозе 1,5 мкг гемагглютинаина.

Интенсивность репродукции вирусов в верхних и нижних отделах дыхательного тракта оценивалась с помощью титрования гомогенатов тканей в развивающихся куриных эмбрионах [4]. Изъятие тканей верхнего отдела дыхательных путей и легких производили на 3 сутки после заражения. В каждой из групп, подвергшихся праймированию, бустированию и заражению одним из четырех вирусов, было отобрано по 4 мыши; 50% инфекционную дозу рассчитывали по методу Рида и Менча [13].

Титры антигемагглютинирующих антител в сыворотках крови иммунизированных живот-

Таблица 2. Характеристики вирусов

Table 2. Characteristics of viruses

	Вирусы Viruses	Описание, доза Description, doses
ЖГВ* LAIV*	A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2)	Штамм для ЖГВ, содержащий 7 генов (6 внутренних белков и нейраминидазы) от донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и 1 ген (гемагглютинаина) от вируса NIBRG-23. Вводилась интраназально в дозе 100 $\text{MID}_{50}/50$ мкл Strain for LAIV containing 7 genes (6 genes of internal proteins and gene of NA) from master donor strain A/Leningrad//134/17/57 (H2N2) and 1 gene (HA) from NIBRG-23 strain. Administered intranasally at 100 $\text{MID}_{50}/50 \mu\text{l}$.
ИГВ** IIV**	«Орнифлю» (Микроген, Иркутск) "Orniflu" (Microgen, Irkutsk)	Очищенные гемагглютинин и нейраминидаза вируса NIBRG-23. Вводилась внутримышечно в дозе 1,5 мкг гемагглютинаина/50 мкл Purified HA and NA proteins of NIBRG-23 strain. Administered intramuscularly at 1,5 50 μg of HA/50 μl .
H1N1 wt	A/New York/61/15 (H1N1) wt	Патогенный для мышей вирус. Вводился интраназально в дозе 10 $\text{LD}_{50}/50$ мкл Pathogenic for mice. Administered intranasally at 10 $\text{LD}_{50}/50 \mu\text{l}$.
H5N1 (cl. 1)	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) × PR8	6 внутренних генов от вируса A/PR8 (H1N1) и 2 наружных (гемагглютинаина и нейраминидазы) от птичьего вируса A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) wt. Вводился интраназально в дозе 100 $\text{MID}_{50}/50$ мкл 6 genes of internal proteins from A/PR8 (H1N1) and 2 genes of external proteins (HA, NA) from avian virus A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) wt. Administered intranasally at 100 $\text{MID}_{50}/50 \mu\text{l}$.
H5N1 (cl. 2,1)	A/Indonesia/05/2005 (H5N1) × PR8	6 внутренних генов от вируса A/PR8 (H1N1) и 2 наружных (гемагглютинаина и нейраминидазы) от птичьего вируса A/Indonesia/05/2005 (H5N1) wt. Вводился интраназально в дозе 100 $\text{MID}_{50}/50$ мкл 6 genes of internal proteins from A/PR8 (H1N1) and 2 genes of external proteins (HA, NA) from avian virus A/Indonesia/05/2005 (H5N1) wt. Administered intranasally at 100 $\text{MID}_{50}/50 \mu\text{l}$.
H5N1 (cl. 2,2)	A/NIBRG-23 (H5N1)	6 внутренних генов от вируса A/PR8 (H1N1) и 2 наружных (гемагглютинаина и нейраминидазы) от птичьего вируса A/turkey/Turkey/05/2005 (H5N1) wt. Вводился интраназально в дозе 100 $\text{MID}_{50}/50$ мкл 6 genes of internal proteins from A/PR8 (H1N1) and 2 genes of external proteins (HA, NA) from avian virus A/turkey/Turkey/05/2005 (H5N1) wt. Administered intranasally at 100 $\text{MID}_{50}/50 \mu\text{l}$.

Примечание. *ЖГВ — живая гриппозная вакцина; **ИГВ — инактивированная гриппозная вакцина.

Note. *LAIV — live attenuated influenza vaccine; **IIV — inactivated influenza vaccine.

ных определяли с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА) по общепринятой методике [5]. В качестве антигена использовали вирус A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) в дозе 4 гемагглютинирующих единицы (ГАЕ) на лунку.

Специфичные к вирусу IgG в сыворотках крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя предварительно очищенные с помощью ультрацентрифугирования на градиенте плотности сахарозы (30–60%) вирусы A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2); A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) × PR8; A/Indonesia/05/2005 (H5N1) × PR8; A/NIBRG-23 (H5N1); A/New York/61/15 (H1N1). Антигены сорбировали в дозе 16 ГАЕ на лунку в плоскодонных полистироловых планшетах (Медполимер, Россия) при +4°C в течение 12 ч. Далее после трехкратной промывки лунок планшета фосфатно-солевым буфером с 0,05% Твином-20, добавляли блокирующий раствор 1% бычьего сывороточного альбумина и повторяли промывку. Уровни сывороточных IgG измеряли с помощью меченных пероксидазой хрена моноклональных антител (Sigma) согласно рекомендациям производителя. За титр антител принимали последнее разведение образца, оптическая плотность которого превышала

в 2 и более раза среднее арифметическое значение оптической плотности контрольных лунок (все компоненты кроме образцов).

Количественный анализ CD4⁺ и CD8⁺ T-лимфоцитов селезенки проводили методом проточной цитометрии. Для выявления специфичных к вирусу T-клеток использовали метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (IFN γ) [8] после стимуляции клеток *in vitro* 3 MOI (multiplicity of infection) очищенного вируса A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2). Для определения спонтанной интерферонопродукции, вместо вируса к клеткам добавляли соответствующий объем питательной среды DMEM (Биолот, Россия). При анализе эти данные (отрицательный контроль) вычитались из показателей, полученных для вирусстимулированных клеток. В качестве положительного контроля использовалась стимуляция клеток конканавалином А, который вызывает поликлональную неспецифическую активацию T-лимфоцитов.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни с использованием программ «Statistica 6.0» и «GraphPad Prism 6». Различия считались достоверными, если значение p не превышало 0,05.

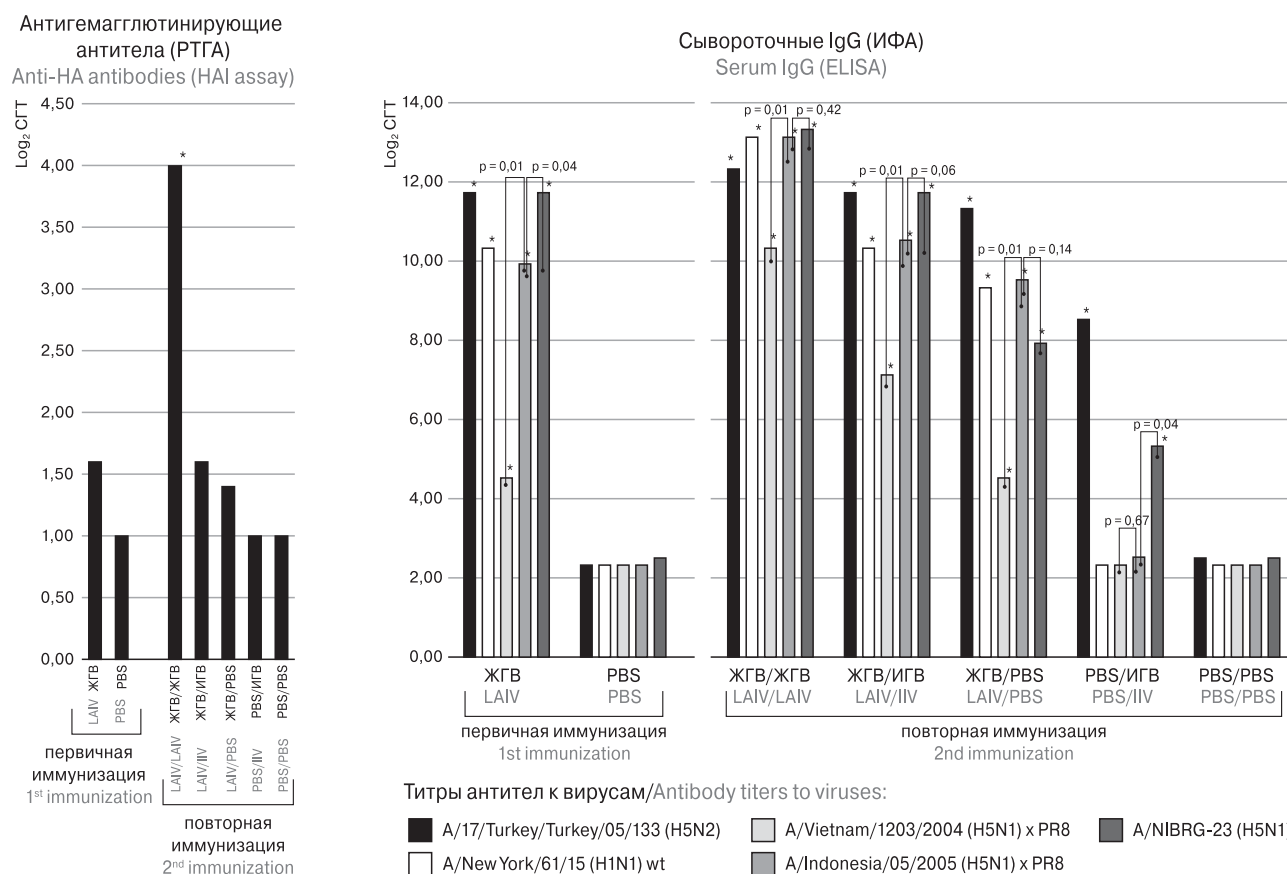


Рисунок 2. Уровни антител к гомологичным и гетерологичным штаммам

Figure 2. Levels of antibodies to homologous and heterologous strains

Результаты

Оба способа прайм-буст вакцинации характеризовались усилением продукции сывороточных антител к гомологичным и гетерологичным штаммам вируса гриппа А. Достоверное увеличение титров антигемагглютинирующих антител к гомологичному штамму по данным РТГА обнаруживалось только при двукратной вакцинации ЖГВ (рис. 2).

Более чувствительный метод ИФА выявил достоверное увеличение титров специфичных к вирусу сывороточных IgG как при обоих способах прайм-буст иммунизации, так и при однократном введении мышам ЖГВ или ИГВ (контрольные группы ЖГВ/PBS и PBS/ИГВ). Бустирование как живой, так и инактивированной вакциной достоверно повышало титры сывороточных IgG к другим генетическим линиям вирусов А (H5N1): в большей степени к гомологичному A/NIBRG-23 (clade 2.2), а также штамму A/Indonesia (clade 2.1) и в меньшей степени к более генетически удаленному A/Vietnam (clade 1), а также к гетерологичному A/New York (H1N1).

При этом однократная вакцинация ЖГВ также вызывала достоверный прирост антител ко всем использованным вирусам, хотя количественно меньший, чем при любой прайм-буст иммунизации. Однократная вакцинация ИГВ увеличивала титры сывороточных IgG только к гомологичным штаммам (A/17/Turkey/Turkey/05/133 (H5N2) и A/NIBRG-23 (H5N1)).

По способности стимулировать специфичные к гомологичному штамму CD8⁺ Т-лимфоциты селезенки, оптимальной схемой оказалась прайм-буст иммунизация ЖГВ/ИГВ,

которая привела к достоверному увеличению этих клеток по сравнению с контрольной группой в отличие от всех остальных случаев. Максимальные количественные показатели уровней CD4⁺ (Th1) клеток достигались при однократном введении любой из вакцин. Повторное введение ЖГВ приводило к снижению количества CD4⁺ с увеличением уровней CD8⁺ Т-лимфоцитов (рис. 3).

В таблице 3 представлены данные о репродукции вируса в дыхательных путях, выживаемости и весе мышей после заражения 10 летальными дозами «дикого» вируса A/New York/61/15 (H1N1). Несмотря на то, что число животных в группе было небольшим (4 мыши), тем не менее схемы прайм-буст ЖГВ/ЖГВ, ЖГВ/ИГВ и ЖГВ/PBS показали достоверный уровень защиты от летального челленджа гетерогенным «диким» вирусом, по сравнению с отрицательным контролем (группа 5). При двукратной иммунизации ЖГВ степень защиты составила 100%, и был достигнут полный клиренс вируса в носовых ходах. Однократная иммунизация ЖГВ хуже справлялась с клиренсом вируса из верхних и нижних дыхательных путей, однако также защитила от летальности всех мышей в группе, в то время как однократная иммунизация ИГВ — только 33,3%.

При экспериментальном заражении (нелетальном) различными вирусами А (H5N1), оба способа прайм-буст иммунизации приводили к практически полному клиренсу вирусов в легких и носовых ходах мышей вне зависимости от штамма. Этот же результат достигался и при однократном введении ЖГВ, а однократной иммунизации ИГВ для достижения такого эффекта оказалось недостаточно (табл. 4).

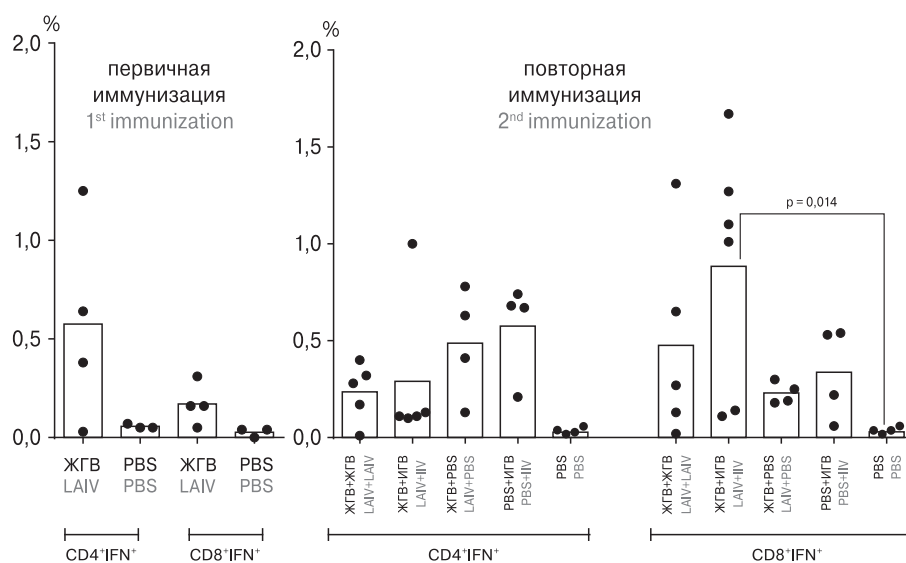


Рисунок 3. Уровни CD4⁺IFNγ⁺ и CD8⁺IFNγ⁺ Т-клеток к гомологичному вирусу A/17/Turkey/Turkey (H5N2)
Figure 3. CD4⁺IFNγ⁺ and CD8⁺IFNγ⁺ T-cell levels to homologous A/17/Turkey/Turkey (H5N2) virus

Таблица 3. Репродукция вируса в дыхательных путях и выживаемость мышей после экспериментального заражения вирусом A/New York/61/15 (H1N1)

Table 3. Influenza A virus reproduction of in mouse respiratory tract and survival rate after challenge with A/New York/61/15 (H1N1) strain

Группа Group	Схема иммунизации Immunization regimen	Титр вируса (lgEID ₅₀ /1 ml) Viral titer (lgEID ₅₀ /1 ml)		% (число) выживших мышей за 14 дней % (number) of mice survived by day 14	Максимальная потеря веса за 14 дней Maximal weight loss by day 14
		Легкие Lungs	Носовые ходы Nasal passage		
1	ЖГВ/ЖГВ LAIV/LAIV	4,4 (3,0–4,9)*	≤ 1,5* (≤ 1,5)	100% (all)	4,7%
2	ЖГВ/ИГВ LAIV/IIV	4,1 (3,7–5,0)*	2,1 (1,5–2,5)*	75% (3/4)	10,0%
3	ЖГВ/PBS LAIV/PBS	5,0 (4,8–5,2)*	2,6 (2,4–2,8)*	100% (all)	14,4%
4	PBS/ИГВ PBS/IIV	5,4 (5,2–5,6)	3,1 (2,5–3,8)	33,3% (1/3)	28,7%
5	PBS/PBS	5,7 (5,5–6,2)	3,6 (3,6–4,2)	25% (1/4)	20,2%

Примечание. *Достоверные снижения титров по сравнению с контрольной группой (p ≤ 0,05).

Note. *Significant decreases in comparison vs. control group (p ≤ 0.05).

Обсуждение

Основная проблема вакцин H5N1 заключается в их низкой иммуногенности для людей [2, 17]. Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) обладает такими преимуществами, как интраназальное введение, возможность производства больших объемов вакцины в краткие сроки, и способность индуцировать долговременную память. Все перечисленное делает ЖГВ оптимальным препаратом выбора в экстренных ситуациях, например, для праймирования населения в начале пандемии. В исследованиях на волонте

рах была доказана праймирующая способность ЖГВ, однако широких исследований по сравнительной оценке иммуногенности и защитной эффективности различных схем прайм-буст иммунизации не проводилось.

Оба рассматриваемых нами способа прайм-буст иммунизации (ЖГВ/ЖГВ и ЖГВ/ИГВ), а также однократная иммунизация ЖГВ достоверно увеличивали титры сывороточных IgG к гетерологичным вирусам, в то время как однократного введения ИГВ для этого оказалось недостаточно. Перед нами не стояло задачи оценить схему ИГВ/ИГВ, однако данные других ав-

Таблица 4. Репродукция вирусов в дыхательных путях после экспериментального заражения вирусами A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) × PR8; A/Indonesia/05/2005 (H5N1) × PR8 и A/NIBRG-23 (H5N1)

Table 4. Reproduction of viruses in mice's respiratory tract after challenge with A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) × PR8; A/Indonesia/05/2005 (H5N1) × PR8 and A/NIBRG-23 (H5N1)

Группа Group	Схема иммунизации Immunization scheme	Титр вируса (lgEID ₅₀ /1 ml) Viral titer (lgEID ₅₀ /1 ml)					
		A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) × PR8		A/Indonesia/05/2005 (H5N1) × PR8		A/NIBRG-23 (H5N1)	
		Легкие Lungs	Носовые ходы Noses	Легкие Lungs	Носовые ходы Noses	Легкие Lungs	Носовые ходы Noses
1	ЖГВ/ЖГВ LAIV/LAIV	≤ 1,5*	≤ 1,5	≤ 1,5*	≤ 1,5*	≤ 1,5*	≤ 1,5
2	ЖГВ/ИГВ LAIV/IIV	≤ 1,5*	≤ 1,5	≤ 1,5*	1,9	≤ 1,5*	≤ 1,5
3	ЖГВ/PBS LAIV/PBS	≤ 1,5*	≤ 1,5	≤ 1,5*	≤ 1,5*	≤ 1,5*	≤ 1,5
4	PBS/ИГВ PBS/IIV	4,1	≤ 1,5	3,9	1,9	3,7	≤ 1,5
5	PBS/PBS	4,1	1,8	5,2	2,7	5,7	≤ 1,5

Примечание. *Достоверные снижения титров по сравнению с контрольной группой (p ≤ 0,05).

Note. *Significant decreases in comparison with control group (p ≤ 0.05).

торов по сплит-вакцине с адьювантом $Al(OH)_3$ [21] и культуральной цельновирионной ИГВ [20] показывают, что при соответствующем подборе доз такая схема тоже будет приводить к значительному увеличению уровней антител против различных штаммов А (H5N1). Эти же авторы [21] в своей публикации приводят данные по защитной эффективности инактивированных вакцин при летальном челлендже мышей вирусами А (H5N1) после гомологичной и гетерологичной прайм-буст иммунизации. Авторы отмечают высокую защитную эффективность как обоих методов прайм-буст, так и однократной вакцинации ИГВ, причем защитный эффект ИГВ был дозозависим. В нашем исследовании высокий уровень защиты от летального челленджа гетерогенным «диким» вирусом А (H1N1) показали схема прайм-буст ЖГВ/ЖГВ и однократная вакцинация ЖГВ. Однократная вакцинация ИГВ плохо защищала мышей в использованной нами дозе (1,5 мкг гемагглютинаина), однако эта же доза в качестве буст-вакцины давала результаты, близкие к схеме ЖГВ/ЖГВ по защитной эффективности и клиренсу вируса А (H1N1) в дыхательных путях. Сходная картина наблюдалась и при экспериментальном заражении различными вирусами А (H5N1).

Стимуляция $CD4^+IFN\gamma^+$ Т-клеток происходила как в опытных, так и в контрольных (однократно вакцинированных) группах приблизительно

одинаково. В отношении $CD8^+IFN\gamma^+$ клеток, максимально выраженный эффект со статистически достоверным приростом $CD8^+$ на 7 день после повторной иммунизации в нашем эксперименте наблюдался только у схемы ЖГВ/ИГВ. Возможно, такой эффект связан с различной скоростью клеточного иммунного ответа при введении разных антигенов [15, 22] и может быть подробнее изучен в отдельном кинетическом эксперименте. Данные, полученные в клинических испытаниях на волонтерах, свидетельствуют о способности как ЖГВ А (H5N2) [18], так и ИГВ А (H5N1) [14] формировать долгоживущие клетки иммунологической памяти, но их фенотипы и антигенная специфичность, судя по имеющимся данным, различаются, что также требует отдельного подробного исследования.

В целом полученные результаты свидетельствуют о формировании перекрестного иммунитета к вирусам А (H5N1), относящимся к различным клейдам. Учитывая сходные данные, полученные с различными вакцинами независимыми группами исследователей [7, 13, 20–21], можно предположить, что перекрестный иммунитет к вирусам А (H1N1) может быть достигнут в случае повторной вакцинации практически любым вакцинным препаратом. Это говорит о целесообразности применения прайм-буст иммунизации для формирования иммунитета к птичьим вирусам А (H5N1).

Список литературы/References

1. Сергеева М.В., Крохин А., Матросович М., Матросович Т., Волшек М., Киселев О.И., Романова Ю.Р. Влияние конформационной стабильности гемагглютинаина вируса гриппа на качество инактивированных вакцин H5N1 // *Microbiology Independent Research Journal*. 2014. Т. 1, № 1. С. 1–11. [Sergeeva M., Krokhin A., Matrosovich M., Matrosovich T., Wolschek M., Kiselev O., Romanova J. H5N1 influenza vaccine quality is affected by hemagglutinin conformational stability. *Microbiology Independent Research Journal*, 2014, vol. 1, no. 1, pp. 1–11. (In Russ.)]
2. Baz M., Luke C.J., Cheng X., Jin H., Subbarao K. H5N1 vaccines in humans. *Virus Res.*, 2013, vol. 178, iss. 1, pp. 78–98.
3. Brooks W.A., Zaman K., Lewis K.D., Ortiz J. R., Goswami D., Feser J., Sharmeen A.T., Nahar R., Rahman M., Rahman M.Z., Barin B., Yunus M., Fry A.M., Bresee J., Azim T., Kathleen K.M. Efficacy of a Russian-backbone live attenuated influenza vaccine among young children in Bangladesh: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Glob. Health*, 2016, vol. 4: e946–e954.
4. Caspard H., Heikkinen T., Belshe R.B., Ambrose C.S. A systematic review of the efficacy of live attenuated influenza vaccine upon revaccination of children. *Hum. Vacc. Immunother.*, 2016, vol. 12, no. 7, pp. 1721–1727.
5. Cottey R., Rowe C.A., Bender B.S. Influenza virus. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2001, chapter 19: unit 19.11. doi: 10.1002/0471142735.im1911s42
6. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003–2015. URL: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20150303CumulativeNumberH5N1cases.pdf
7. Ebensen T., Debarry J., Pedersen G.K., Blazejewska P., Weissmann S., Schulze K., McCullough K.C., Cox R.J., Guzmán C.A. Mucosal administration of cycle-di-nucleotide-adjuvanted virosomes efficiently induces protection against influenza H5N1 in mice. *Front. Immun.*, 2017, vol. 8: 1223.
8. Foster B., Prussan C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2007, chapter 6: unit 6.24. doi: 10.1002/0471142735.im0624s78
9. Friede M., Palkonyay L., Alfonso C., Pervikov Y., Torelli G., Wood D., Kiény M.P. WHO initiative to increase global and equitable access to influenza vaccine in the event of a pandemic: supporting developing country production. *Vaccine*, 2011, suppl. 29: A2–A7. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.02.079
10. Goji N.A., Nolan C., Hill H., Wolff M., Noah D.L., Williams T.B., Rowe T., Treanor J.J. Immune responses of healthy subjects to a single dose of intramuscular inactivated influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) vaccine after priming with an antigenic variant. *J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 198, iss. 5, pp. 635–641.
11. Houser K., Subbarao K. Influenza vaccines: challenges and solutions. *Cell Host Microbe*, 2015, vol. 17, no. 3, pp. 295–300.

12. Ikeno D., Kimachi K., Kudo Y., Goto S., Itamura S., Odagiri T., Tashiroc M. Kino Y. A prime-boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains. *Vaccine*, 2009, vol. 27, iss. 23, pp. 3121–3125.
13. Matsuoka Y., Lamirande E.W., Subbarao K. Mouse model for Influenza. *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2009, chapter 15: unit 15G.3. doi: 10.1002/9780471729259.mc15g03s13
14. Nayak J.L., Richards K.A., Yang H., Treanor J.J., Sant A.J. Effect of influenza A(H5N1) vaccine prepandemic priming on CD4+ T-cell response. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 211, iss. 9, pp. 1408–1417.
15. Peng Y., Wang B., Talaat K., Karron R., Powell T.J., Zeng H., Dong D., Luke C.J., McMichael A., Subbarao K., Dong T. Boosted influenza-specific T cell responses after H5N1 pandemic live attenuated influenza virus vaccination. *Front. Immunol.*, 2015, vol. 6: 287.
16. Pitisuttithum P., Boonnak K., Chamnanchanunt S., Puthavathana P., Luvira V., Lerdsamran H., Kaewkungwal J., Lawpoolsri S., Thanachartwet V., Silachamroon U., Masamae W., Schuetz A., Wirachwong P., Thirapakpoomanunt S., Rudenko L., Sparrow E., Friede M., Kieny M.P. Safety and immunogenicity of a live attenuated influenza H5 candidate vaccine strain A/17/Turkey/Turkey/05/133 H5N2 and its priming effects for potential pre-pandemic use: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis.*, 2017, vol. 17, iss. 8, pp. 833–842.
17. Rudenko L., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Naykhin A., Donina S., Larionova N., Pisareva M., Krivitskaya V., Flores J; Russian LAIV Trial Study Group. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study. *Vaccine*, 2015, vol. 33, iss. 39, pp. 5110–5117.
18. Rudenko L., Naykhin A., Donina S., Korenkov D., Petukhova G., Isakova-Sivak I., Losev I., Stukova M., Erofeeva M., Nikiforova A., Power M., Flores J. Assessment of immune responses to H5N1 inactivated influenza vaccine among individuals previously primed with H5N2 live attenuated influenza vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2015, vol. 11, no. 12, pp. 2839–2848.
19. Rudenko L., Yeolekar L., Kiseleva I., Isakova-Sivak I. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: process challenges and success stories. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 45, pp. 5436–5441.
20. Sabarth N., Howard M.K., Savidis-Dacho H., van Maurik A., Barrett P.N., Kistner O. Comparison of single, homologous prime-boost and heterologous prime-boost immunization strategies against H5N1 influenza virus in a mouse challenge model. *Vaccine*, 2010, vol. 28, pp. 650–656.
21. Stephenson I., Nicholson K.G., Colegate A., Podda A., Wood J., Ypma E., Zambon M. Boosting immunity to influenza H5N1 with MF59-adjuvanted H5N3 A/Duck/Singapore/97 vaccine in a primed human population. *Vaccine*, 2003, vol. 21, no. 15, pp. 1687–1693.
22. Wang Z., Loh L., Kedzierski L., Kedzierska K. Avian influenza viruses, inflammation, and CD8+ T Cell immunity. *Front. Immunol.*, 2016, vol. 7: 60.
23. WHO. Influenza (Seasonal). 2016. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en> (04.12.2017)

Авторы:

Лосев И.В., научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Петухова Г.Д., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Исакова-Сивак И.Н., к.б.н., руководитель лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Руденко Л.Г., д.б.н., заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела вирусологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Losev I.V., Researcher, Laboratory of Immunology and Viral Disease Prevention, Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Petukhova G.D., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunology and Viral Disease Prevention, Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Isakova-Sivak I.N., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Viral Disease Prevention, Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Rudenko L.G., PhD, MD (Biology), Honored Worker of Science of the Russian Federation, Head of the Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.03.2018
 Отправлена на доработку 11.03.2019
 Принята к печати 14.03.2019

Received 04.03.2018
 Revision received 11.03.2019
 Accepted 14.03.2019