

РЕАКЦИЯ МИКРОНЕЙТРАЛИЗАЦИИ В СРАВНЕНИИ С РЕАКЦИЕЙ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ПРИ ОЦЕНКЕ ИММУНОГЕННОСТИ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН И ДИАГНОСТИКЕ ГРИППА

В.З. Кривицкая¹, Е.В. Кузнецова¹, В.Г. Майорова¹, Р.А. Кадырова¹, Н.И. Львов²,
А.А. Го³, А.А. Соминина¹

¹ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБВОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования являлось сравнение результатов реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции микронейтрализации при детекции антител к вирусам гриппа А(Н1N1), А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) в сыворотках людей, а также оптимизация условий постановки реакции микронейтрализации. Предложенный вариант реакции микронейтрализации основан на выявлении снижения репродукции вируса гриппа в инфицированных клетках MDCK в присутствии вирусспецифичных сывороточных антител. Репродукцию вирусов в клетках оценивали иммуноферментным методом в 96-луночных культуральных планшетах с помощью типоспецифичных моноклональных антител, направленных к NP-белку вирусов гриппа А. Параллельно в реакции микронейтрализации и РТГА были проанализированы парные сыворотки 205 волонтеров, привитых инактивированными сезонными гриппозными вакцинами, а также 117 взрослых пациентов, переболевших лабораторно подтвержденным гриппом. Доказана целесообразность обработки сывороток человека рецептор-разрушающим энзимом (RDE) при постановке не только РТГА, но и реакции микронейтрализации. Показана большая чувствительность реакции микронейтрализации по сравнению с РТГА. По данным микронейтрализации показатели частоты сероконверсий и кратности прироста антител к вирусам гриппа А у вакцинированных и переболевших людей превышали в 1,4–2,5 раза результаты, полученные в РТГА. Более высокая чувствительность реакции микронейтрализации имела большое значение при расшифровке заболевания, вызванного новым патогеном. Эффективность серодиагностики гриппа А(Н1N1)pdm09 у ПЦР-положительных пациентов была в 1,5 раза выше по результатам реакции микронейтрализации по сравнению с РТГА. Согласно традиционным представлениям, основанным на результатах ранних работ, титр гриппспецифичных антител 1/40, выявленный в РТГА, считается защитным. При этом общепринятого протективного уровня вирусспецифичных антител для реакции нейтрализации до сих пор не установлено. Уровни антител в сыворотках, выявленные при использовании предложенного варианта реакции микронейтрализации, были значительно выше, чем по результатам РТГА. В поствакцинальных сыворотках привитых волонтеров среднегрупповые титры вируснейтрализующих антител, соответствующие 1/40 в РТГА, составили

Адрес для переписки:

Кривицкая Вера Зорьевна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17,
ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ.
Тел./факс: 8 (812) 499-15-29 (служебн.); 8 921 886-37-95 (моб.).
E-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Contacts:

Vera Z. Krivitskaya
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professor Popov str.,
15/17, Smorodintsev Research Institute of Influenza.
Phone/fax: +7 (812) 499-15-29 (office); +7 921 886-37-95 (mobile).
E-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Библиографическое описание:

Кривицкая В.З., Кузнецова Е.В., Майорова В.Г., Кадырова Р.А.,
Львов Н.И., Го А.А., Соминина А.А. Реакция микронейтрализации
в сравнении с реакцией торможения гемагглютинации при оценке
иммуногенности гриппозных вакцин и диагностике гриппа // Инфекция
и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 763–772. doi: 10.15789/2220-7619-
2019-5-6-763-772

Citation:

Krivitskaya V.Z., Kuznecova E.V., Majorova V.G., Kadyrova R.A.,
Lvov N.I., Go A.A., Somina A.A. Microneutralization reaction compared
to hemagglutination inhibition assay to evaluate immunogenicity of influenza
vaccines and influenza diagnostics // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 763–772.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-763-772

1/195, 1/203 и 1/426–1/430 для вирусов гриппа А(H1N1), А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) соответственно. В сыворотках переболевших гриппом пациентов эти же показатели составили 1/285, 1/215 и 1/488. В соответствии с этим для реакции микронейтрализации порогами для «условно протективного» уровня антител у взрослых вакцинированных волонтеров или заболевших пациентов предложено считать в титры 1/160 для вирусов А(H1N1) и А(H1N1)pdm09, а также 1/320 для вируса А(H3N2), что согласуется с данными других исследователей.

Ключевые слова: реакция микронейтрализации, реакция торможения гемагглютинации, гриппозные вакцины, взрослые пациенты, грипп А(H1N1), грипп А(H3N2).

MICRONEUTRALIZATION REACTION COMPARED TO HEMAGGLUTINATION INHIBITION ASSAY TO EVALUATE IMMUNOGENICITY OF INFLUENZA VACCINES AND INFLUENZA DIAGNOSTICS

Krivitskaya V.Z.^a, Kuznecova E.V.^a, Majorova V.G.^a, Kadyrova R.A.^a, Lvov N.I.^b, Go A.A.^c, Sominina A.A.^a

^a Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

^b Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defence of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to compare the results of the hemagglutination inhibition test (HI-test) and micro-neutralization reaction in detection of antibodies to influenza A(H1N1), A(H1N1)pdm09, and A(H3N2) viruses in human sera, as well optimize microneutralization reaction conditions. The proposed variant of microneutralization reaction is based on detecting decreased influenza virus reproduction in infected MDCK cells in the presence of virus-specific serum antibodies. Virus reproduction was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay in 96-well cell culture plates using type-specific anti-influenza A virus NP-protein monoclonal antibodies. In parallel, in microneutralization reaction and HI-test paired sera collected from 205 volunteers inoculated with inactivated seasonal influenza vaccines were analyzed, as well as from 117 adult patients with laboratory-confirmed influenza. The rationale for treatment of human serum with receptor-destroying enzyme (RDE) was proved not only for HI-test, but also for microneutralization reaction. Compared to HI-assay, the microneutralization reaction displayed higher sensitivity. According to microneutralization data, seroconversion rates and increase in antibody titer against influenza A viruses in both vaccinated and infected persons were superior to HI-test data by 1.4–2.5-fold. Moreover, higher sensitivity of this method was of great importance for the diagnostics of disease caused by new pathogens. The efficacy of influenza A(H1N1)pdm09 serodiagnostics in PCR-positive patients was 1.5 times higher based on microneutralization reaction vs. HI-assay data. According to the data from early studies, it is commonly believed that 1/40 titer of flu-specific antibodies detected by HI-test is set as protective. However, a consensus on protective level for virus-specific antibodies in neutralization reaction has not been established yet. It was found that serum antibody levels detected by the proposed version of microneutralization reaction were significantly higher than those in HI-assay. In the post vaccination sera collected from vaccinated volunteers, average titers of virus neutralizing antibodies corresponding to 1/40 in HI-test were 1/195, 1/203, and 1/426–1/430 for influenza A(H1N1), A(H1N1)pdm09 and A(H3N2), respectively, whereas in influenza patients they were 1/285, 1/215 and 1/488, respectively. Thus, it was suggested to consider a threshold value for “conditionally protective” level of neutralizing antibodies in adult vaccinated volunteers or infected patients, an average titer 1/160 for A(H1N1) and A(H1N1)pdm09 viruses, as well as 1/320 — for A(H3N2) virus, which agree with data published elsewhere.

Key words: microneutralization reaction, hemagglutination inhibition assay, influenza vaccines, adult patients, influenza A(H1N1), influenza A(H3N2).

В исследованиях, связанных с гриппом, серологические методы используют для оценки иммуногенности вакцин, уровня популяционного иммунитета, а также диагностики заболевания. Наиболее широко применяемым тестом для выявления противогриппозных антител (АТ) является реакция торможения гемагглютинации (РТГА), поскольку этот метод специфичен и прост в исполнении. Помимо этого, еще в ранних работах была установлена корреляция между титрами АТ в РТГА и уровнем защиты от заболевания гриппом [10, 15], что до сих пор используется при оценке иммуногенности гриппозных вакцин. Однако традиционная постановка РТГА имеет ряд ограничений. Прежде всего, чувствительность реакции во многом за-

висит от видовой принадлежности и качества эритроцитов [20]. Наиболее существенным недостатком является низкая чувствительность при детекции АТ, взаимодействующих с гемагглютинином (ГА) вирусов птичьего происхождения, включая пандемические вирусы А(Н5) и А(Н7) [16, 20, 24].

При оценке АТ, направленных к вирусам гриппа, для ИФА показана высокая чувствительность [3]. Однако наличие консервативных эпитопов в молекуле ГА, общих для многих субтипов вируса гриппа А, обуславливает невозможность использовать данный метод для выявления субтипоспецифичных АТ даже в случае использования в качестве антигена высокоочищенного ГА [16]. Помимо этого, не показано

корреляции между уровнем АТ, определяемых в ИФА, титрами АТ в РТГА и протективной активностью АТ [21].

В качестве альтернативного метода при выявлении АТ к вирусам гриппа птиц в сыворотках людей и оценке иммуногенности вакцин против птичьего гриппа успешно используют реакцию микронейтрализации (МН) [7, 17]. Метод основан на выявлении с помощью моноклональных АТ (МКА), специфичных к NP-белку вируса гриппа, уровня снижения репродукции вируса в инфицированной культуре клеток MDCK в присутствии противогриппозных АТ.

В настоящее время реакция МН все шире внедряется в лабораторную практику. Так, в 2014 г. Комитет Европейского медицинского агентства по лекарственным средствам для человека (European Medicines Agency) рекомендовал применять этот тест наряду с РТГА для оценки иммуногенности всех гриппозных вакцин [8]. Метод субтипоспецифичен и, в отличие от РТГА, которая выявляет лишь АТ, направленные к рецепторному карману молекулы ГА, позволяет оценивать уровень АТ, реагирующих со всеми нейтрализующими эпитопами как в составе ГА, так и нейраминидазы вирусов гриппа. Таким образом, реакция МН отражает противовирусные свойства АТ значительно шире, чем РТГА. В многочисленных исследованиях показано, что реакция МН является более чувствительным методом по сравнению с РТГА при детекции АТ, направленных к вирусам гриппа человека и животных [9, 16, 19, 23].

Однако в то время как протокол проведения и оценки полученных результатов РТГА регламентирован [1, 2, 8], единые международные стандарты для реакции МН до сих пор отсутствуют. Этим объясняются значительные межлабораторные расхождения при выявлении нейтрализующих АТ в одних и тех же образцах [20].

Целью настоящего исследования являлось сравнение результатов РТГА и реакции МН при детекции АТ к вирусам гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) в сыворотках вакцинированных и переболевших гриппом людей, а также оптимизация условий постановки реакции МН.

Материалы и методы

Клинические материалы. В реакции МН и РТГА параллельно были проанализированы:

- пре- и поствакцинальные сыворотки 55 взрослых волонтеров, однократно привитых в 2008 г. трехвалентной инактивированной сезонной гриппозной вакциной «А»;
- пре- и поствакцинальные сыворотки 150 взрослых волонтеров, однократно привитых в 2016 г. четырехвалентной инактивированной гриппозной вакциной «Б»;

– парные сыворотки 117 взрослых пациентов, полученные в острой (2–4 день) и реконвалесцентной (7–15 день) стадиях заболевания.

Больные были госпитализированы в клинику г. Санкт-Петербурга. В первую группу вошли переболевшие гриппом А(Н1N1) в 1999–2008 гг. (21 человек). Вторая группа включала 28 пациентов, болевших гриппом А(Н1N1)pdm09 с ноября 2009 по 2010 гг. 68 человек, перенесших грипп А(Н3N2) в сезон 2014–2015 гг., составили третью группу. Диагноз гриппа А, а также субтип вируса, вызвавшего заболевание, были установлены на основании данных ПЦР при анализе назальных мазков с использованием наборов «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A type FL» и «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL» (Интерлабсервис, Москва) и/или по выявлению прироста субтипоспецифичных IgG в парных сыворотках при использовании ИФА-тест-систем (ООО «ППДП», Санкт-Петербург).

Вирусные штаммы. В РТГА и реакции МН были использованы вирусы A/New Caledonia/20/99 (H1N1); A/Brisbane/59/07 (H1N1); A/California/07/09 (H1N1)pdm09; A/Brisbane/10/07 (H3N2); A/Texas/50/12 (H3N2); A/Switzerland/9715293/13 (H3N2); A/Hong Kong/4801/14 (H3N2), полученные из музейной коллекции вирусов гриппа и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) была проведена в соответствии с Методическими указаниями МУ 3.3.2.1758-03 2003 [2] с использованием гриппозных диагностикумов (ООО «ППДП», Санкт-Петербург). Сыворотки крови (в разведении 1/10) предварительно обрабатывали рецептор-разрушающим энзимом (Receptor Destroying Enzyme, RDE) производства «Denka Seiken Co., LTD» (Япония) с последующим прогреванием при 56°C в течение 30 мин. При постановке реакции использовали 0,5% куриные эритроциты.

Определение титров АТ в реакции микронейтрализации (МН). Клеточную культуру MDCK, полученную из коллекции «Influenza Reagent Resource» (IRR, США), выращивали в течение 24 ч в 96-луночных планшетах Nunclon (Thermo Fisher Scientific, Дания) при 37°C в CO₂-термостате в среде Игла-МЭМ (ООО «БиолоГ», Санкт-Петербург) до плотности 80–90%. Для анализа сыворотки крови прогревали при 56°C в течение 30 мин после (или без) обработки RDE (Denka Seiken Co., LTD, Япония). Двукратные разведения анализируемых сывороток соединяли с равными объемами (по 50 мкл) вирусов гриппа, содержащих 100 ТЦД₅₀. Для разведения вирусов и сывороток использовали среду Игла-МЭМ (ООО «БиолоГ», Санкт-Петербург) с добавлением 0,126 мг/мл аргинина и 2 мг/мл ТРСК-трипсина

(Sigma, США). Смеси инкубировали 2 ч при 37°C в CO₂-термостате. После этого 100 мкл смеси «вирус+сыворотка» вносили в лунки с клетками MDCK, двукратно отмытые средой Игла-МЕМ (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург). Рабочую дозу вируса контролировали заражением клеток его 10-кратными разведениями. Планшеты выдерживали 72 ч в CO₂-термостате. После удаления среды клетки фиксировали (200 мкл/лунку) 80% холодным ацетоном (ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург) в течение 20 мин. После отмывания планшетов ингибирование репродукции вируса в присутствии АТ учитывали в микрокультуральном ИФА с использованием пероксидазного конъюгата МКА 6D11 (6D11-Пх), взаимодействующих с NP-белком вирусов гриппа А различных субтипов. Все МКА и МКА-Пх получены в ФГБУ НИИ гриппа. В лунки вносили по 100 мкл 6D11-Пх, разведенного 1/5000 5% обезжиренным молоком (ЗАО «СИ-Проджект», Санкт-Петербург) на 0,01М фосфатно-солевом буфере (ФСБ-М), рН 7,4. После часовой инкубации планшетов при 37°C и отмывки ФСБ (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург) в лунки добавляли 100 мкл субстрат-хромогенной смеси, содержащей 0,05% H₂O₂ (ЗАО «ЛенРеактив», Санкт-Петербург) и 0,1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma, США) в 0,1М ацетат-цитратном буфере (ЗАО «ЛенРеактив», Санкт-Петербург), рН 5,0. Через 20 мин реакцию останавливали (50 мкл/лунку) 2N H₂SO₄ (ЗАО «ЛенРеактив», Санкт-Петербург). Оптическую плотность при длине волны 450 нм (OD₄₅₀) определяли на фотометре Multiskan MS (Labsystems, Финляндия). Конечным нейтрализующим титром АТ считали последнее разведение сыворотки, при котором наблюдалось не менее чем двукратное снижение OD₄₅₀ по сравнению с контролем репродукции вируса (100 ТЦД₅₀ вируса в отсутствие сыворотки).

Приготовление конъюгатов МКА с пероксидазой хрена (МКА-Пх) осуществляли периодатным методом [14].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием компьютерной программы «StatstDirect». Мерой взаимосвязи между двумя переменными служил коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Для сравнения двух выборок по частоте выявления признаков использовали точный критерий Фишера. Проверяемые критериями нулевые гипотезы отвергались при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Одна из задач проведенного исследования состояла в оптимизации условий проведения реакции МН, включая необходимость обработки сывороток RDE для устранения неспецифи-

ческих реакций, обусловленных содержанием в крови ингибиторов, чувствительных к нейраминидазе.

Были проанализированы пре- и поствакцинальные сыворотки 55 взрослых волонтеров, однократно привитых в 2008 г. трехвалентной инактивированной сезонной гриппозной вакциной «А». Методом сравнения служила РТГА, для которой все проанализированные сыворотки были подвергнуты термической обработке (56°C в течение 30 мин) после воздействия RDE. Реакцию МН проводили в двух вариантах: пробы были прогреты при 56°C после или без обработки RDE.

Оценка гуморального иммунного ответа по отношению к вирусам гриппа А(H1N1) и А(H3N2) выявила, что такие показатели иммуногенности вакцин, как частота сероконверсий и кратность прироста АТ, не отличались по результатам РТГА и реакции МН, проведенной с пробами, не обработанными RDE. Введение RDE привело к снижению титров нейтрализующих АТ. При этом СГТ в сыворотках до вакцинации снижались в 2,4 раза, а после вакцинации — в значительно меньшей степени (только в 1,2–1,5 раза) по сравнению с показателями нейтрализующей активности, полученными без использования RDE. С другой стороны, после такой обработки в реакции МН наблюдалось увеличение показателей частоты сероконверсий и кратности прироста АТ, особенно (в 1,7–2 раза) при детекции АТ к вирусу гриппа А(H3N2), по сравнению как с РТГА, так и с реакцией МН без использования RDE (табл. 1).

Эти результаты свидетельствуют о целесообразности обработки сывороток человека RDE при постановке не только РТГА, но и реакции МН. В этой связи все последующие опыты при анализе иммуногенности вакцины «Б» и иммунного ответа у больных были проведены с применением RDE в обоих тестах.

При таких условиях титры АТ, выявленные в реакции МН, коррелировали с титрами в РТГА для всех анализированных вирусов гриппа А. Коэффициенты корреляции (r) для титров АТ в сыворотках, полученных после вакцинации или в реконвалесцентной фазе заболевания гриппом, составляли 0,60–0,85 ($p < 0,001$).

По результатам оценки эффективности инактивированной вакцины «Б» частота сероконверсий в ответ на иммунизацию была одинакова по данным обоих тестов. Однако для вирусов гриппа А обоих субтипов, СГТ АТ, оцененные в реакции МН, были значительно выше по сравнению с показателями РТГА в сыворотках, полученных как до, так и после вакцинации: в 1,8–2,2 раза для вируса А(H1N1)pdm09

и 3,8–4,3 раза для А(Н3N2). Кратность прироста АТ также была выше в 1,4–1,6 раза в реакции МН по сравнению с РТГА (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о большей чувствительности реакции МН по сравнению с РТГА. Это особенно четко проявлялось при оценке гуморального иммунного

ответа у больных с лабораторно подтвержденным гриппом. Частота сероконверсий нейтрализующих АТ ко всем трем вирусам — А(Н1N1), А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) — была выше на 18–29%, чем соответствующие показатели РТГА. СГТ АТ к вирусам гриппа в сыворотках реконвалесцентов и кратность прироста АТ также

Таблица 1. Характеристика иммуногенности вакцины «А» по отношению к вирусам гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) (по результатам РТГА и реакции МН)

Table 1. Immunogenicity of vaccine “A” against influenza A(H1N1) and A(H3N2) viruses (results of hemagglutination inhibition test and microneutralization reaction)

Параметры Characteristics	А(Н1N1)			А(Н3N2)		
	РТГА (с RDE) HI-test (with RDE)	Реакция МН Microneutralization reaction		РТГА (с RDE) HI-test (with RDE)	Реакция МН Microneutralization reaction	
		без RDE without RDE	с RDE with RDE		без RDE without RDE	с RDE with RDE
Частота сероконверсий (%) Seroconversion rates (%)	72,7	72,7	80,0	50,9	50,9	69,1
Среднеарифметические титры антител в сыворотках до/после вакцинации (обратные величины) Arithmetic mean antibody titers in sera before/after vaccination (reciprocal values)	55,0/252,7	219,9/938,2	102,0/739,9	53,4/154,7	302,9/950,5	220,5/898,2
Среднегеометрические титры антител (СГТ) в сыворотках до/после вакцинации (обратные величины) Geometric mean antibody titers (GMT) in sera before/after vaccination (reciprocal values)	19,3/148,3	89,6/585,9	36,3/372,2	25,4/95,4	160,0/557,1	65,4/438,5
Кратность прироста антител между сыворотками до и после вакцинации Increase in antibody titers among pre and post vaccination sera	7,7	7,0	10,2	3,8	3,5	6,7
Условно защитные титры антител (обратные величины) в поствакцинальных сыворотках* Conditionally protective antibody titers (reciprocal values) in post vaccination sera*	40	262	203	40	464	430
Частота выявления условно защитных титров антител после вакцинации (%)** Frequency of conditionally protective antibody titers detected after vaccination (%)**	89,1	94,5	81,8	90,9***	81,8	72,7***
Число обследованных волонтеров The number of volunteers	55			55		

Примечания. Вирусы, использованные для РТГА и реакции МН: А/Brisbane/59/07 (H1N1); А/Brisbane/10/07 (H3N2). *Условно защитными титрами антител в реакции МН считали титры АТ, соответствующие 1/40 в РТГА. **При подсчетах защитными титрами АТ в реакции МН считали титры не ниже 1/160 и 1/320 для вирусов А(Н1N1) и А(Н3N2). Для РТГА $\geq 1/40$ для обоих вирусов. *** $p = 0,02$.

Notes. Viruses used for hemagglutination inhibition test (HI-test) and microneutralization reaction: A/Brisbane/59/07 (H1N1); A/Brisbane/10/07 (H3N2). *Conditionally protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers corresponding to 1/40 in HI-test. **Protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers not lower than 1/160 and 1/320 for A(H1N1) and A(H3N2) viruses. In HI-test – $\geq 1/40$ for both viruses. *** $p = 0,02$.

превышали в реакции МН эти же показатели РТГА в 1,9–9,5 и 1,8–2,5 раза соответственно (табл. 3).

По традиционным представлениям, основанным на результатах ранних работ [10, 15], титр грипп-специфичных АТ 1/40, выявленный в РТГА, считается защитным. При этом общепринятого протективного уровня вирусспецифичных АТ для реакции нейтрализации до сих пор не существует.

В задачу настоящего исследования входило определение «условно защитных» титров нейтрализующих АТ, специфичных к вирусам гриппа А различных субтипов, соответствующих титру 1/40 в РТГА.

Как было показано выше, титры АТ в сыворотках, выявленные в реакции МН, были значительно выше, чем в тех же пробах по резуль-

татам РТГА. В поствакцинальных сыворотках привитых волонтеров среднегрупповые титры вируснейтрализующих АТ, соответствующие 1/40 в РТГА, составили 1/195, 1/203 и 1/426–1/430 для вирусов гриппа А(Н1N1), А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) соответственно (табл. 1 и 2). В сыворотках переболевших гриппом пациентов эти же показатели составили 1/285, 1/215 и 1/488 (табл. 3).

В соответствии с этим для предложенной постановки реакции МН порогами для «условно протективных» титров АТ у взрослых вакцинированных волонтеров или заболевших пациентов были приняты в среднем титры 1/160 для вирусов А(Н1N1) и А(Н1N1)pdm09, а также 1/320 для вируса А(Н3N2).

Следует отметить, что при условии принятия данных порогов частота выявления условно за-

Таблица 2. Характеристика иммуногенности вакцины «Б» по отношению к вирусам гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) (по результатам РТГА и реакции микронейтрализации)

Table 2. Immunogenicity of vaccine "B" against influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses (results of HI-test and the microneutralization reaction)

Параметры Characteristic	А(Н1N1)pdm09		А(Н3N2)	
	РТГА HI-test	Реакция МН Microneutralization reaction	РТГА HI-test	Реакция МН Microneutralization reaction
Частота сероконверсий (%) Seroconversion rates (%)	56,0	56,0	62,7	63,3
Среднеарифметические титры антител в сыворотках до/после вакцинации (обратные величины) Arithmetic mean antibody titers in sera before/after vaccination (reciprocal values)	54,2/141,4	114,7/359,9	22,5/90,3	110,7/415,5
Среднегеометрические титры антител (СГТ) в сыворотках до/после вакцинации (обратные величины) Geometric mean antibody titers (GMT) in sera before/after vaccination (reciprocal values)	25,4/101,7	44,7/218,1	11,9/53,0	42,7/233,7
Кратность прироста антител между сыворотками до и после вакцинации Increase in antibody titers among pre and post vaccination sera	9,4	12,7	10,1	15,5
Условно защитные титры антител (обратные величины) в поствакцинальных сыворотках* Conditionally protective antibody titers (reciprocal values) in post vaccination sera*	40	195	40	426
Частота выявления условно защитных титров антител после вакцинации (%)** Frequency of conditionally protective antibody titers detected after vaccination (%)**	96,0#	74,0#	78,0##	58,0###
Число обследованных волонтеров The number of volunteers	150		150	

Примечания. Вирусы, использованные для РТГА и реакции МН: А/California/07/09 (Н1N1)pdm09, А/Hong Kong/4801/14 (Н3N2).

*Условно защитными титрами антител в реакции МН считали титры АТ, соответствующие 1/40 в РТГА. **При подсчетах защитными титрами АТ в реакции МН считали 1/160 для вирусов А(Н1N1)pdm09 и 1/320 для вируса А(Н3N2). Для РТГА — \geq 1/40 для обоих вирусов. #p < 0,0001, ##p = 0,0003.

Notes. Viruses used for hemagglutination inhibition test and microneutralization reaction: A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/4801/14 (H3N2). *Conditionally protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers corresponding to 1/40 in HI-test. **Protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers not lower than 1/160 and 1/320 for A(H1N1) pdm09 and A(H3N2) viruses. In HI-test — \geq 1/40 for both viruses. #p < 0,0001, ##p = 0,0003.

Таблица 3. Гуморальный иммунный ответ на инфицирование вирусами гриппа А у взрослых пациентов (по результатам РТГА и реакции микронейтрализации)

Table 3. Humoral immune response to influenza A virus infection in adult patients (results of HI-test and the microneutralization reaction)

Параметры Characteristic	Вирус — возбудитель заболевания Causative agent of viral diseases					
	А(Н1N1)		А(Н1N1)pdm09		А(Н3N2)	
	РТГА HI-test	Реакция МН Microneutralization reaction	РТГА HI-test	Реакция МН Microneutralization reaction	РТГА HI-test	Реакция МН Microneutralization reaction
Частота сероконверсий (%) Seroconversion rates (%)	66,7 [#]	95,2 [#]	60,7 ^{##}	89,3 ^{##}	66,2 ^{###}	89,7 ^{###}
Среднеарифметические титры антител в сыворотках, полученных в острой/реконвалесцентной фазе заболевания (обратные величины) Arithmetic mean antibody titers in sera obtained in acute/convalescent phases of the disease (reciprocal values)	27,4/ 187,6	187,9/1310,5	37,8/ 107,3	86,9/229,6	36,8/ 182,6	132,9/954,4
Среднегеометрические титры антител (СГТ) в сыворотках, полученных в острой/реконвалесцентной фазе заболевания (обратные величины) Geometric mean antibody titers (GMT) in sera obtained in acute/convalescent phases of the disease (reciprocal values)	20,0/ 100,8	91,3/951,0	16,4/ 59,4	20,5 /113,2	24,3/ 101,1	37,6/292,0
Кратность прироста антител в парных сыворотках Increase in antibody titers in paired sera	10,0	18,6	5,6	11,6	7,9	20,1
Условно защитные титры антител (обратные величины) в сыворотках реконвалесцентов* Conditionally protective antibody titers (reciprocal values) in sera of convalescent patients*	40	285	40	215	40	488
Частота выявления условно защитных титров антител в сыворотках реконвалесцентов (%)** Frequency of conditionally protective antibody titers in sera of convalescent patients (%)**	85,7	90,4	75,0	53,6	88,2 ^{***}	54,4 ^{***}
Число обследованных пациентов The number of patients	21		28		68	
Время проведения обследования Time of the study	1999–2008		2009–2010		2014–2015	

Примечания. Вирусы, использованные для РТГА и реакции МН: А/New Caledonia/20/99 (H1N1); А/California/07/09 (H1N1)pdm; А/Texas/50/12 (H3N2); А/Switzerland/9715293/13 (H3N2). *Условно защитными титрами антител в реакции МН считали титры, соответствующие 1/40 в РТГА. **При подсчетах защитными титрами АТ в реакции МН считали 1/160 для вирусов А(Н1N1), А(Н1N1)pdm09 и 1/320 для вирусов А(Н3N2). Для РТГА — $\geq 1/40$ для всех вирусов. [#]p = 0,018, ^{##}p = 0,03, ^{###}p = 0,0013, ^{***}p < 0,0001.

Notes. Viruses used for hemagglutination inhibition test and microneutralization reaction: А/New Caledonia/20/99 (H1N1); А/California/07/09 (H1N1)pdm; А/Texas/50/12; А/Switzerland/9715293/13 (H3N2). *Conditionally protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers corresponding to 1/40 in HI-test. **Protective antibody titers in microneutralization reaction believed titers not lower than 1/160 and 1/320 for А(Н1N1), А(Н1N1)pdm09 and А(Н3N2) viruses. In HI-test — $\geq 1/40$ for both viruses. [#]p = 0,018, ^{*}p = 0,03, ^{###}p = 0,0013, ^{***}p < 0,0001.

щитных титров АТ к вирусам гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) была значимо ниже в реакции МН, чем РТГА, как у волонтеров после вакцинации, так и у переболевших пациентов (табл. 1, 2, 3).

Обсуждение

Одной из причин искажения результатов серологических реакций может быть неспецифическое взаимодействие вирусных поверхностных гликопротеинов с целым рядом молекул, содержащихся в сыворотках животных и человека. Такие ингибиторы, являющиеся компонентом врожденного иммунитета, блокируют рецептор-связывающие сайты ГА, конкурируя с АТ за связь с вирусом гриппа [12]. В стандартную процедуру подготовки сывороток к постановке РТГА, помимо термического воздействия при 56°C в течение 30 мин для устранения термолabile ингибиторов, входит также обработка RDE [2, 18] для разрушения термостабильных компонентов, содержащих сиаловые кислоты и мимикрирующих под структуру клеточных рецепторов для вирусов.

Общепринятым для реакции МН является прогревание сывороток при 56°C, но нет единого мнения о необходимости использования RDE. Например, в руководстве ВОЗ предписывается обрабатывать RDE только сыворотки животных [18]. Протоколы проведения реакции МН, предлагаемые другими авторами, рекомендуют такую обработку также для сывороток человека, что увеличивает чувствительность метода [11].

При отработке условий постановки реакции МН мы опирались на существующие руководства и исследования [11, 18], а также на собственный многолетний опыт по сравнению различных диагностических тестов.

Оценка гуморального иммунного ответа по отношению к вирусам гриппа А(Н1N1) и А(Н3N2) показала, что введение RDE при постановке реакции МН приводило к снижению титров нейтрализующих АТ. При этом СГТ в сыворотках до вакцинации снижались в 2,4 раза, а после вакцинации — в значительно меньшей степени (только в 1,2–1,5 раза) по сравнению с показателями нейтрализующей активности, полученными без использования RDE.

Такие различия могут указывать на то, что в крови здоровых взрослых людей (в пробах до вакцинации) содержание неспецифических ингибиторов, являющихся частью врожденного иммунитета, выше, чем в поствакцинальных сыворотках, поскольку у привитых лиц превалирует вирусспецифичный адаптивный иммунный ответ. Именно за счет большего снижения уровня противогриппозных АТ в пробах, взятых до вакцинации, можно объяснить повышение чувствительности теста МН, в том чис-

ле по сравнению с РТГА, поскольку обработка сывороток RDE позволяет более четко выявлять сероконверсии к вирусам гриппа А в парных сыворотках вакцинированных волонтеров и больных людей.

Более высокая чувствительность реакции МН по сравнению с РТГА имело особенно большое значение для детекции АТ к вирусу А(Н1N1)pdm09. На момент проведения анализа в 2009 г. этот новый патоген только начинал циркулировать на территории России, а иммунитет к нему у основной части населения практически отсутствовал, что обусловило повышенную частоту постгриппозных осложнений. Эффективность серодиагностики гриппа А(Н1N1)pdm09 у ПЦР-положительных пациентов была в 1,5 раза выше по результатам реакции МН по сравнению с РТГА. В этой связи для расшифровки природы заболевания и оценки эпидситуации применение тестов с высокой диагностической чувствительностью играло первостепенное значение.

Активно обсуждаемой в литературе является проблема выбора маркеров предсказания протективного уровня противогриппозного гуморального иммунного ответа. В ранних работах было показано, что наличие в крови грипп-специфичных АТ с титром 1/40 по данным РТГА обеспечивает, по крайней мере, 50% снижение риска заражения гриппом в человеческой популяции [10, 15]. Однако в более поздних исследованиях было установлено, что этот показатель может сильно варьировать в зависимости от возраста пациентов, характеристик популяции, типа вакцины и особенностей заболевания [4, 5, 8, 22].

Так, титры АТ 1/40 против сезонных вирусов гриппа, определенные РТГА в сыворотках людей, были ассоциированы лишь с 22–31% защитой от заболевания. При этом 50% защита от гриппа А коррелировала с титрами АТ в РТГА, равными 1/110 у вакцинированных детей и 1/255–1/260 у привитых взрослых волонтеров [5, 22].

Оценка заболеваемости гриппом А(Н3N2) показала, что для достижения одного и того же уровня протекции титр вирусспецифичных АТ, определенный в РТГА, должен быть более чем в 4 раза выше у людей старше 65 лет, по сравнению с более молодыми пациентами [4].

Челлендж-наблюдения за волонтерами, инфицированными вирусом А(Н1N1)pdm09, показали, что между группами с высоким содержанием АТ ($\geq 1/40$ по данным РТГА) и низким уровнем АТ (титры ниже 1/40) не было выявлено достоверных различий в частоте проявления симптомов заболевания. При этом по сравнению с антигемагглютинирующей активностью большая корреляция с защитой от заболевания была показана для антинейраминидазной активности АТ [13].

Таким образом, вопрос о величине порога протективных гриппозных АТ в настоящее время дискутируется. Тем не менее, уровень АТ 1/40 принят за протективный в современных документах, регламентирующих оценку эффективности новых гриппозных вакцин методом РТГА [1, 8]. При этом данный параметр для реакции МН вообще не установлен. Условно протективный титр нейтрализующих АТ определяют, как правило, путем выявления нейтрализующей активности АТ, соответствующей титру 1/40 в РТГА. Этот показатель значительно варьирует и зависит от особенностей постановки метода МН в различных лабораториях [21].

Как правило, титры АТ, определенные в реакции МН для вирусов гриппа, коррелируют с титрами в РТГА, но превышают их. Так, по данным разных авторов, нейтрализующие титры АТ к вирусам гриппа А, соответствующие условно протективному титру 1/40 в РТГА, варьируют в широких пределах: 1/532–1/962 в иммунных сыворотках хорьков [19] и 1/40–1/275 у вакцинированных людей [6, 9, 21, 23]. При этом протективные титры АТ, оцененные в реакции МН, у взрослых людей были выше в 4 раза, чем у детей ($\geq 1/160$ и 1/40 соответственно) [6].

Выявленные нами пороги условно протективных титров нейтрализующих АТ к вирусам гриппа А у взрослых вакцинированных волонтеров и заболевших пациентов согласуются с результатами, полученными другими исследователями. В соответствии с этим при оценке эффективности вакцин защитными титрами АТ к вирусам гриппа А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) в реакции МН должны считаться показатели не ниже 1/160 и 1/320, а не 1/40, как принято для РТГА. Следует отметить, что при таких пороговых значениях частота условно защитных титров АТ у волонтеров после вакцинации и переболевших пациентов была ниже по результатам реакции МН, чем РТГА. С учетом показанной большей чувствительности предложенного варианта постановки МН, эти данные ставят вопрос о заниженном критерии оценки протективности АТ методом РТГА (титр $\geq 1/40$), что обсуждается также в работах других исследователей.

Таким образом, предложенный вариант реакции МН является высокочувствительным методом и может быть рекомендован в качестве дополнительного теста при оценке эффективности новых гриппозных вакцин и серодиагностике гриппа.

Список литературы/References

1. Изучение популяционного иммунитета к гриппу у населения Российской Федерации: Методические указания МУ 3.1.3490-17 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 27 октября 2017 г.) [Study of population immunity against influenza in the population of the Russian Federation: Methodical guideline MU 3.1.3490-17 (approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation on October 27, 2017)].
2. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа: Методические указания МУ 3.3.2.1758-03 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28 сентября 2003 г.) [Methods for determining the quality indicators of immunobiological preparations for the prevention and diagnosis of influenza: Methodological guidelines MU 3.3.2.1758-03 (approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation on September 28, 2003)]
3. Alvarez M.M., López-Pacheco F., Aguilar-Yañez J.M., Portillo-Lara R., Mendoza-Ochoa G.I., García-Echauri S., Freiden P., Schultz-Cherry S., Zertuche-Guerra M.I., Bulnes-Abundis D., Salgado-Gallegos J., Elizondo-Montemayor L., Hernández-Torre M. Specific recognition of influenza A/H1N1/2009 antibodies in human serum: a simple virus-free ELISA method. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 4: e10176. doi: 10.1371/journal.pone.0010176
4. Benoit A., Beran J., Devaster J.M., Esen M., Launay O., Leroux-Roels G., McElhaney J.E., Oostvogels L., van Essen G.A., Gaglani M., Jackson L.A., Vesikari T., Legrand C., Tibaldi F., Innis B.L., Dewé W. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection against seasonal A/H3N2 influenza disease. *Open Forum Infect. Dis.*, 2015, vol. 2, no. 2: ofv067. doi: 10.1093/ofid/ofv067
5. Black S., Nicolay U., Vesikari T., Knuf M., Del Giudice G., Della Cioppa G., Tsai T., Clemens R., Rappuoli R. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2011, vol. 30, pp. 1081–1085. doi: 10.1097/INF.0b013e3182367662
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 2009, vol. 58, no. 19, pp. 521–524.
7. Ehrlich H.J., Müller M., Oh H.M., Tambyah P.A., Joukhadar C., Montomoli E., Fisher D., Berezuk G., Fritsch S., Löw-Baselli A., Vartian N., Bobrovsky R., Pavlova B.G., Pöllabauer E.M., Kistner O., Barrett P.N. Baxter H5N1 Pandemic Influenza Vaccine Clinical Study Team. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N. Engl. J. Med.*, 2008, vol. 358, no. 24, pp. 2573–2584. doi: 10.1056/NEJMoa073121
8. EMA, Guideline on influenza vaccines. Non-clinical and clinical module. Draft. 2016.
9. Grund S., Adams O., Wählisch S., Schweiger B. Comparison of hemagglutination inhibition assay, an ELISA-based micro-neutralization assay and colorimetric microneutralization assay to detect antibody responses to vaccination against influenza A H1N1 2009 virus. *J. Virol. Methods*, 2011, vol. 171, no. 2, pp. 369–373. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.11.024
10. Hobson D., Curry R.L., Beare A.S., Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J. Hyg.*, 1972, vol. 70, pp. 767–777.

11. Lin Y., Gu Y., McCauley J.W. Optimization of a quantitative micro-neutralization assay. *J. Vis. Exp.*, 2016, vol. 118: e54897. doi: 10.3791/54897
12. Matrosovich M., Gao P., Kawaoka Y. Molecular mechanisms of serum resistance of human influenza H3N2 virus and their involvement in virus adaptation in a new host. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, no. 8, pp. 6373–6380.
13. Memoli M.J., Shaw P.A., Han A., Czajkowski L., Reed S., Athota R., Bristol T., Fargis S., Risos K., Powers J.H., Davey R.T., Taubenberger J.K. Evaluation of antihemagglutinin and antineuraminidase antibodies as correlates of protection in an influenza A/H1N1 virus healthy human challenge model. *mBio*, 2016, vol. 7, no. 2: e00417-16. doi: 10.1128/mBio.00417-16
14. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 1974, vol. 22, no. 12, pp. 1084–1091. doi: 10.1177/22.12.1084
15. Potter C.W., Oxford J.S. Determinants of immunity to influenza infection in man. *Br. Med. Bull.*, 1979, vol. 35, pp. 69–75.
16. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J., Thompson W.W., Lu X., 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, pp. 937–943.
17. Rudenko L., Kiseleva I., Naykhin A.N., Erofeeva M., Stukova M., Donina S., Petukhova G., Pisareva M., Krivitskaya V., Grudinina M., Buzitskaya Zh., Isakova-Sivak I., Kuznetsova S., Larionova N., Desheva J., Dubrovina I., Nikiforova A., Victor J., Neuzil K., Flores J., Tsvetnitsky V., Kiselev O. Assessment of human immune responses to H7 avian influenza virus of pandemic potential: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study of live attenuated H7N3 influenza vaccine. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 2: e87962. doi: 10.1371/journal.pone.0087962
18. Serological diagnosis of influenza by microneutralization assay. WHO Manual. 2010.
19. Stephenson I., Das R.G., Wood J.M., Katz J.M. Comparison of neutralising antibody assays for detection of antibody to influenza A/H3N2 viruses: an international collaborative study. *Vaccine*, 2007, vol. 25, no. 20, pp. 4056–4063. PMID: 17412461. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.02.039
20. Stephenson I., Wood J.M., Nicholson K.G., Zambon M.C. Sialic acid receptor specificity on erythrocytes affects detection of antibody to avian influenza haemagglutinin. *J. Med. Virol.*, 2003, vol. 70, pp. 391–398. doi: 10.1002/jmv.10408
21. Trombetta C.M., Montomoli E. Influenza immunology evaluation and correlates of protection: a focus on vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*, 2016, vol. 15, no. 8, pp. 967–976. doi: 10.1586/14760584.2016.1164046
22. Tsang T.K., Cauchemez S., Perera R.A., Freeman G., Fang V.J., Ip D.K., Leung G.M., Malik Peiris J.S., Cowling B.J. Association between antibody titers and protection against influenza virus infection within households. *J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 210, no. 5, pp. 684–692. doi: 10.1093/infdis/jiu186
23. Verschoor C.P., Singh P., Russell M.L., Bowdish D.M., Brewer A., Cyr L., Ward B.J., Loeb M. Correction: Microneutralization assay titres correlate with protection against seasonal influenza H1N1 and H3N2 in children. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 6: e0131531. doi: 10.1371/journal.pone.0131531
24. Zhu H., Ding X., Chen X., Yao P., Xu F., Xie R., Yang Z., Liang W., Zhang Y., Li Y., Shen J., He P., Guo Z., Su B., Sun S., Zhu Z. Neutralizing antibody but not hemagglutination antibody provides accurate evaluation for protective immune response to H5N1 avian influenza virus in vaccinated rabbits. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 33, pp. 5421–5423. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.067

Авторы:

Кривицкая В.З., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Кузнецова Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Майорова В.Г., старший научный сотрудник лаборатории изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Кадырова Р.А., младший научный сотрудник лаборатории клеточных культур ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Львов Н.И., д.м.н., доцент, профессор кафедры инфекционных болезней ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия;

Го А.А., к.м.н., врач-инфекционист клинко-диагностического отделения ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Соминина А.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Krivitskaya V.Z., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory for the Study of Risk Factors for Influenza and ARVI, St. Petersburg, Russian Federation;

Kuznecova E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for the Study of Risk Factors for Influenza and ARVI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Majorova V.G., Senior Researcher, Laboratory for the Study of Risk Factors for Influenza and ARVI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Kadyrova R.A., Junior Researcher, Laboratory of Cell Cultures, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;

Lvov A.I., PhD, MD (Medicine), Assistant Professor, Professor of Department of Infectious Diseases, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation;

Go A.A., PhD (Medicine), Infectious Disease Physician, Clinical Diagnostic Department, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Sominina A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory for the Study of Risk Factors for Influenza and ARVI, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.