

На правах рукописи

Лосев
Игорь Владимирович

**Особенности развития адаптивного иммунного ответа к вирусам гриппа А
(H5N1), А(H5N2) и А(H2N2)**

03.02.02 Вирусология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель –
д.м.н., проф. А.Н. Найхин

Санкт-Петербург
2017

Оглавление

Оглавление	2
Список сокращений	114
1. Введение	5
2. Обзор литературы	13
2.1. Потенциально пандемический птичий вирус гриппа А (H5N1)	13
2.1.1. Общие сведения о вирусе гриппа А (H5N1).....	13
2.1.2 Поражение людей гриппом А (H5N1).....	14
2.1.3 Иммунизация людей вакцинами из вирусов с гемагглютинином H5	16
2.1.4 Иммунологические обследования людей	19
2.2 Потенциально пандемический антропонозный вирус гриппа А(H2N2) 20	20
2.2.1. Общие сведения о вирусе гриппа А(H2N2).....	20
2.2.2 Пандемия гриппа А (H2N2) 1957-1968 гг. и вакцинация людей против этого возбудителя	21
2.2.4. Иммунологические обследования людей	23
2.3. Актуальные вопросы формирования адаптивного иммунитета к вирусам гриппа А.....	24
2.3.1. Роль Т-клеток в защите людей от гриппа А	25
2.3.2 Т-клеточный иммунный ответ при иммунизации людей гриппозными вакцинами.....	25
2.3.3. Иммунологическая память у людей при гриппозной инфекции и вакцинации	26

2.3.4. Гетеросубтипический иммунитет людей к вирусам гриппа А.....	30
2.3.5. Мутации в генах внутренних белков вирусов гриппа А и иммунный ответ	31
2.3.6. Плазмобластные поликлональные антитела (PPab), секретируемые Т-лимфоцитами <i>in vitro</i>	32
Заключение	34
3. Материалы и методы.....	37
3.1. Вакцины	37
3.2. Обследованные контингенты.....	37
3.3. Штаммы	37
3.4 Эксперимент на мышах	38
3.5 Реакция торможения гемагглютинации.....	39
3.6 Реакция микронейтрализации.....	40
3.7 Иммуноферментный анализ.....	40
3.8 Определение в ИФА антител, секретируемых <i>in vitro</i> культурами МПК (PPAb)	41
3.9 Определение вирусспецифических CD4+ и CD8+ Т-клеток иммунологической памяти.....	42
3.10 Статистическая обработка результатов.....	43
4. Собственные исследования	44
Глава 4.1. Формирование постинфекционного гетеросубтипического иммунитета у людей к птичьим (H5N1, H5N2) и человеческому (H2N2) вирусам гриппа А в условиях современного эпидемического процесса.	44
Резюме.....	51

Глава 4.2. Гомологичный и гетерологичный иммунный ответ людей на ЖГВ H5N2.....	52
Резюме.....	62
Глава 4.3. Индукция у людей ЖГВ H5N2 гомологичной (H5N2) и гетерологичной (H5N1) долговременной иммунологической памяти	64
Резюме.....	75
Глава 4.4. Экспериментальное исследование иммунного ответа к потенциально пандемическому вирусу гриппа A(H2N2).....	77
Резюме.....	86
5. Обсуждение полученных результатов	88
Список литературы	115

1. Введение

Актуальность темы. На протяжении многих десятилетий проблема гриппа А привлекает пристальное внимание ученых и средств массовой информации. Это связано, с одной стороны, с приобретенным опытом тяжелых последствий для человечества прошедших пандемий, вызванных вирусом гриппа А подтипов H1N1, H2N2 и H3N2, с другой, постоянной угрозой появления новых пандемических вариантов этого возбудителя. По мнению экспертов ВОЗ наиболее вероятным этиологическим агентом будущей пандемии может стать вирус гриппа А (H2N2), циркулировавший среди людей в 1957-1968 гг., или один из вирусов гриппа птиц с гемагглютинидами H5, H6, H7 и H9 [36]. Данные вирусы вызывали вспышки гриппа среди людей в различных регионах планеты, которые характеризовались тяжелыми клиническими проявлениями с повышенной летальностью. Во время вспышек гриппа А (H5N1) 2003-2005 гг. смертность достигала 60% [29]. В этой связи ВОЗ разработан Глобальный план мероприятий [36], направленный на борьбу с перечисленными потенциально пандемическими вирусами гриппа А в случае появления угрозы их активного распространения среди людей. Он включает, во-первых, разработку арсенала резервных вакцин против всех этих вирусов, во-вторых, проведение форсированного молекулярно-генетического исследования вирусов гриппа птиц с точки зрения возможности окончательного преодоления ими межвидового барьера, сопровождающегося активной передачей от человека к человеку, в-третьих, накопление знаний по иммунологии потенциально пандемических вирусов гриппа А.

Настоящая работа посвящена исследованию особенностей развития различных звеньев постинфекционного и поствакцинального адаптивного иммунитета к двум представителям потенциально пандемических вирусов гриппа А: вирусу гриппа птиц H5N1 как наиболее патогенному для людей и вирусу H2N2, имеющему высокую вероятность рециркуляции. Главный акцент в исследовании живой гриппозной вакцины (ЖГВ) H5N2 смещен в сторону стимуляции этой

вакциной иммунного ответа к потенциально пандемическому вирусу гриппа А (H5N1).

Для научного обоснования прогноза развития эпидситуации по гриппу А и правильного планирования объема профилактических мероприятий необходим мониторинг состояния коллективного иммунитета – одного из главных составляющих эпидемиологического надзора. В мировой литературе неоднократно декларировалось положение о полном отсутствии у населения иммунитета к потенциально пандемическим зоонозным вирусам гриппа А. В этой связи сформировалось довольно распространенное мнение о катастрофических последствиях для человечества таких пандемий. Однако подобный прогноз не учитывал одно важное обстоятельство – формирование у населения гетеросубтипического иммунитета, то есть кроссреактивного иммунитета, генерируемого вируса гриппа одного подтипа против других подтипов. Он стимулируется общими для всех подтипов вируса гриппа А антигенными детерминантами и играет важную роль в клиренсе возбудителя из организма и в снижении тяжести гриппозной инфекции[94].

Знания по иммунологии потенциально пандемических вирусов гриппа А необходимы как для прогнозирования с иммунологических позиций эпидситуации при появлении угрозы распространения новых пандемических вариантов, так и для выбора в чрезвычайной ситуации правильной стратегии вакцинопрофилактики с позиции иммуногенности тех или иных существующих вакцинных препаратов в отношении стимуляции иммунного ответа к новому возбудителю. Кроме того, сведения об особенности развития кроссреактивного иммунного ответа у людей полезны для конструирования универсальной вакцины против всех циркулирующих и потенциальных пандемических подтипов вируса гриппа А. В последние годы это направление активно развивается [156, 181].

Степень разработанности темы. В мировой литературе в связи с особой актуальностью имеется огромное число работ по изучению вируса А(H5N1). Проведен эпидемиологический и клинический анализ вызванных им вспышек, а также подробный молекулярно-генетический анализ этого возбудителя [37, 52, 72,

126, 141, 172, 178]. В экспериментах на животных изучена его иммуногенность [57, 59, 106, 132, 191]. Показано присутствие в сыворотках крови человека антител к консервативным эпитопам НА вируса А(Н5N1) [60, 168]. Установлено наличие у некоторых лиц кроссреактивных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, специфичных преимущественно к NP того же вируса [42, 127]. Однако работа по комплексному исследованию состояния гетеросубтипического иммунитета людей к данному возбудителю, включающему тестирование циркулирующих антител, локальных антител и различных субпопуляций Т-клеток иммунологической памяти, не проводилась.

Оценена способность ЖГВ Н5N1 индуцировать у добровольцев гуморальный иммунный ответ к вирусам с той же антигенной формулой [Talaat et al. 2014]. В клинических испытаниях исследователями из США изучены праймирующие свойства ЖГВ Н5N1 в отношении бустирования гуморального иммунного ответа людей на отдаленную во времени вакцинацию ИГВ Н5N1 [Karron et al. 2009]. Все препараты произведены в США.

В современной литературе работы по иммунологии вируса гриппа А (Н2N2) немногочисленны, несмотря на то, что данный вирус представляет не меньшую потенциальную опасность, чем вирусы гриппа птиц. Из сывороток крови людей, родившихся после прекращения циркуляции вируса гриппа А(Н2N2) в 1968 году, были выделены моноклональные антитела к данному вирусу. [116]. В модельных опытах мышам и хорькам показана индукция кроссреактивных сывороточных антител к вирусам гриппа А (Н2N2), циркулировавшим среди людей [58, 146]. В Японии проведен серозидемиологический анализ сывороточных антител к вирусу А (Н2N2) в препаратах иммуноглобулинов, приготовленных в 1993-2010 гг. [119]. У людей, не праймированных вирусом гриппа А (Н2N2), выделены CD4+ Т-клеточные эпитопы, реагирующие с гемагглютинином Н2 [76]. До настоящего времени целенаправленные по возрасту исследования по оценке современного состояния различных звеньев адаптивного популяционного иммунитета к вирусу гриппа А(Н2N2) у людей не проводились. Нет сведений об иммуногенных

свойствах вакцинных штаммов для ЖГВ H2N2 с точки зрения их способности стимулировать разные звенья адаптивного иммунного ответа.

В процессе работы основное внимание было сосредоточено на поиске ответов на следующие актуальные, но недостаточно изученные вопросы иммунологии гриппа А:

1. Каковы особенности формирования у людей постинфекционного гетеросубтипического иммунитета к потенциально пандемическим вирусам гриппа А в условиях современного эпидемического процесса, обусловленного циркуляцией вирусов гриппа А (H1N1) и А (H3N2)?
2. В чем заключаются особенности развития поствакцинального иммунного ответа к потенциально пандемическим вирусам гриппа А?
3. Способны ли вакцины, приготовленные из поражающих птиц вирусов гриппа А, индуцировать у людей долговременную Т- и В- клеточную память – главный защитный фактор адаптивного иммунитета?

Поиск ответов на эти вопросы базировался на изучении иммунологии трех вирусов: вируса гриппа А (H2N2), циркулировавшего в человеческой популяции в 1957-1968 гг., и двух вирусов гриппа А (H5N1) и А (H5N2), поверхностные антигены которых характерны для вирусов, поражающих птиц.

Цель работы: изучить особенности формирования системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного иммунного ответа к вирусам гриппа А подтипов H5N1, H5N2 и H2N2.

Задачи:

4. Оценить состояние гетеротипического иммунитета у людей к вирусам гриппа А подтипов H5N1, H5N2 и H2N2 в период циркуляции актуальных вирусов гриппа А подтипов H1N1 и H3N2.
5. Охарактеризовать особенности развития у людей поствакцинального системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на отечественную ЖГВ H5N2.
6. Оценить способность этой вакцины индуцировать у людей долговременную Т- и В- клеточную иммунологическую память к

вакцинному штамму вируса гриппа А подтипа H5N2 и к вирусу гриппа А подтипа H5N1.

7. В эксперименте на мышах сравнить количественно-качественные показатели гуморального и Т-клеточного адаптивного иммунного ответа на аттенуированные и не аттенуированные штаммы вируса гриппа А подтипа H2N2.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного иммунитета к вирусам гриппа А подтипов H5N1, H5N2 и H2N2 у людей разного возраста. На основании полученных данных охарактеризованы особенности формирования естественно индуцируемого кроссреактивного иммунитета населения к этим вирусам в условиях эпидемической циркуляции вирусов гриппа А подтипов H1N1 и H3N2.

Впервые осуществлено комплексное исследование иммуногенности отечественной ЖГВ H5N2, включающее оценку индукции у людей поствакцинального гомологичного и гетерологичного иммунного ответа, а также стимуляцию долговременной В-клеточной иммунологической памяти. Полученные данные позволили, во-первых, обосновать возможность использования ЖГВ H5N2 для защиты от потенциально пандемического вируса гриппа А (H5N1), во-вторых, разработать адекватную схему оценки иммуногенных свойств ЖГВ, в состав которых вошли штаммы приготовленные из вирусов гриппа А, циркулирующих среди птиц.

Впервые оценена праймирующая способность ЖГВ усиливать у людей секрецию В-клетками *in vitro* особого пула антител на отдаленную во времени вакцинацию ИГВ. По этим данным описаны особенности поствакцинальной продукции этого пула антител и обоснована возможность использования данного теста для оценки иммуногенности гриппозных вакцин.

Впервые проведено сравнительное исследование *in vivo* способности индуцировать разные звенья адаптивного иммунитета не аттенуированными и аттенуированными вирусами гриппа А (H2N2) с разным набором мутаций в генах внутренних белков, привнесенных обратногогенетическим методом от донора

аттенуации А/Ленинград/17/134/57 (H2N2). Полученные результаты позволили выделить перспективные штаммы-кандидаты в вакцинные для приготовления ЖГВ (H2N2).

Теоретическая и практическая значимость. Иммунология гриппа А базируется на данных об иммунитете к актуальным вирусам гриппа людей. Теоретические аспекты настоящей работы примыкают к новому направлению – изучению гомологичного и гетерологичного иммунного ответа людей к не циркулирующим потенциально пандемическим вирусам гриппа А зоонозного и антропонозного происхождения. Полученные нами сведения расширяют знания об особенностях формирования гомологичного и гетерологичного иммунного ответа в условиях современного эпидемического процесса и противогриппозной вакцинации. Полученные данные позволили обосновать ряд практических рекомендаций по применению и оценке иммуногенности резервных вакцин.

Методология и методы исследования. Основной методологической базой являлись иммунологические исследования разных звеньев адаптивного иммунитета к вирусам гриппа А подтипов H5N1, H5N2 и H2N2. С этой целью использован широкий набор иммунологических методов для выявления: (i) циркулирующих сывороточных антител, (ii) секретируемых *in vitro* сывороточных антител, (iii) локальных IgA-антител в СВДП и слюне, (iv) вирусспецифических Т-клеток иммунологической памяти различных фенотипов. Кроме того, применяли вирусологические методы при стандартизации экспериментальных исследований *in vivo*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У большинства лиц, праймированных вирусами гриппа А подтипа H2N2, то есть родившихся до 1957 г., сохранена в активном состоянии системная и локальная В-клеточная память к данному возбудителю.
2. У людей, не встречавшихся с вирусами гриппа А подтипов H5N1, H5N2 и H2N2, обнаружены кроссреактивные локальные IgA-антитела и Т-клетки памяти, специфичные к этим вирусам.

3. Отечественная ЖГВ H5N2 может быть успешно применена для защиты людей от потенциально пандемического вируса гриппа А (H5N1).
4. Для адекватной оценки иммуногенности ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа А необходимо использовать комплекс иммунологических тестов по детекции системных гуморальных, локальных гуморальных и Т-клеточных иммунных реакций.

Личный вклад автора. Автор лично принимал участие в проведении всех этапов иммунологической части исследований: планирование опытов, отбор материалов, постановка иммунологических тестов, воспроизведение экспериментов на мышах. Автором лично проведена обработка, анализ и обобщение полученных материалов с последующей их публикацией и презентацией на различных конференциях и симпозиумах. Отбор добровольцев, формирование групп, вакцинация, клинические наблюдения и постановка реакции микронеутрализации проведена сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность проведенных исследований подтверждена адекватным статистическим анализом данных. Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на 5 отечественных и международных конференциях: Options for the control of influenza VIII, Cape Town, South Africa, September 5-10, 2013; 2nd Russian young scientists' conference "Problems of biomedical science of 3rd millenium", November 12 – 14 2012; II Всероссийская научная конференция молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» 12 – 14 ноября 2012; Научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» 23–25 апреля 2014 г., Санкт-Петербург; European Scientific Working group on Influenza, Рига, сентябрь 2014; XV Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» 1 - 4 июня 2015 года, а также на заседаниях отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе в 8 российских журналах, входящих в перечень, рекомендованных ВАК, 3 - в иных изданиях, 2 из которых в зарубежном журнале, индексируемом в международных системах цитирования: библиографические базы Web of science, SCOPUS, Pub Med, а также в сборниках материалов 6 конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, перечня материалов и методов, изложения результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 154 страницах машинописного текста, включая 28 таблиц и 5 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 216 источников, из них 25 в отечественных и 191 в иностранных изданиях.

Работа проведена при финансовой и кураторской поддержке международного фонда PATH Vaccine solutions, а также Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-32250).

Внедрение результатов исследования. Все исследования иммуногенности других резервных вакцин (ЖГВ H7N3, H7N9, H2N2) выполняли по схеме, апробированной в настоящей работе, то есть с применением комплексного исследования главных составляющих адаптивного иммунного ответа: системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного. Получено свидетельство о внедрении метода «Технология оценки поствакцинальной секреции антител культурой В-лимфоцитов *in vitro*» (регистрационный номер 557-15008-и, дата регистрации – 16 ноября 2015 года).

2. Обзор литературы

В главном настоящая работа посвящена исследованию адаптивного иммунитета к потенциально пандемическим вирусам гриппа А: к птичьему H5N1 и антропонозному H2N2. Поэтому структура и содержание обзора отражает ключевые компоненты этой тематики: вирус H5N1, вирус H2N2 и адаптивный противогриппозный иммунитет.

Подтипы вируса гриппа А классифицируются по поверхностным белкам вириона, то есть по гемагглютинуину (HA) и нейраминидазе (NA). На сегодняшний день отдифференцировано 18 подтипов, включающих 18 HA и 9 NA. По отношению к хозяину они разделяются на антропонозные (H1N1, H2N2, H3N2), и зоонозные – все остальные, поражающие птиц и животных. Птичьи вирусы имеют гемагглютинин от H1 до H16 и нейраминидазу N1 – N9.

2.1. Потенциально пандемический птичий вирус гриппа А (H5N1)

С 1946 г. спорадически регистрируются среди людей вспышки гриппа, вызванные зоонозными подтипами, преимущественно птичьими и свиными [178]. Абсолютное большинство заболевших имели тесный контакт с ними в домашних и промышленных хозяйствах. С 1997 г. Зарегистрировано глобальное распространение среди людей птичьих вирусов H5N1, H7N3 и H7N9 [52, 172, 178, 200].

2.1.1. Общие сведения о вирусе гриппа А (H5N1)

Птичьи вирусы гриппа А по признаку патогенности для цыплят делятся на две группы: высокопатогенные (HPAI) и низкопатогенные (LPAI) [193]. Большинство птичьих вирусов относятся к низкопатогенным, и вызывают у хозяев бессимптомную или слабо выраженную инфекцию. Некоторые штаммы вируса гриппа А с гемагглютينيном H5 и H7 относятся к высокопатогенным. Они подвержены шифтовым и дрейфовым изменениям и могут вызывать тяжелые эпизоотии среди домашних и диких птиц [78, 144]. Однако большинство штаммов с перечисленными гемагглютинидами являются низкопатогенными.

Высокопатогенный вирус H5N1 впервые был идентифицирован в 1959 г. во время эпизоотии среди домашних птиц [40]. В настоящее время разделяют десять групп (клайдов) высокопатогенных вирусов H5N1 по антигенным и генетическим признакам. Эти вирусные клайды циркулируют среди диких и домашних птиц [145], но инфицируют и млекопитающих (кошки, собаки, свиньи) [41, 63]. С 2005 г вирусы H5N1 распространились среди людей по всему миру, включая Азию, Африку, Европу и Средний Восток [111]. Этому способствовала миграция диких птиц, а также провоз домашних птиц через пограничные барьеры. Четыре клайда патогенных вирусов H5N1 (клайды 0, 1, 2 и 7) и три подкласса клайдов (2.1, 2.2 и 2.3) вызвали в глобальном масштабе заболевания среди людей [37, 145]. Всего грипп А (H5N1) поразил население 16 стран.

По экспериментальным данным *in vitro* и *in vivo*, вирус H5N1 передается от птиц человеку за счет преимущественного соединения с эпителиальными рецепторами α -2,3 (SA α 2,3Gal), превалирующими в нижних отделах дыхательного тракта людей [59, 177, 179], тогда как антропонозные вирусы гриппа А взаимодействуют главным образом с эпителиальными рецепторами α -2,6 (SA α 2,6Gal), преобладающими в верхних отделах дыхательных путей. По-видимому, после одного цикла репликации в человеческом организме, вирус каким-то образом теряет способность узнавать рецепторы α -2,3, то есть передаваться от человека к человеку [177]. Но это только гипотеза.

2.1.2 Поражение людей гриппом А (H5N1)

Первое заболевание, вызванное патогенным вирусом H5N1, было зарегистрировано в Гонконге в мае 1997 г. у трехлетнего ребенка [186]. Далее в ноябре и декабре того же года идентифицировали еще 18 случаев, из них 6 человек умерли [56]. Клинические признаки включали пневмонию, острый респираторный синдром, Рэй-синдром, множественное поражение органов и реактивные гемофагоцитозы [212]. У большинства заболевших были отмечены посещения птичьих рынков за несколько недель перед клиническими проявлениями болезни [143]. Дальнейшее распространение в 1997-1998 гг. заболевания гриппом А (H5N1) было остановлено благодаря быстрому уничтожению 1,4 миллиона голов

домашней птицы, прекращению импорта птиц из Южного Китая, строгому санитарно-ветеринарному надзору за рынками и птичьими фермами, сплошной вакцинации поголовья в сочетании с дезинфекцией и карательными мерами. Однако после шестилетнего перерыва, в феврале 2003 г. в Гонконге два члена одной семьи, посетившие Южный Китай, заболели гриппом А (H5N1) [152]. Один из них умер. Далее последовали другие заболевания и патогенный вирус H5N1 начал распространяться в 2003-2004 гг. среди жителей Северо-Восточной Азии (Китай, Вьетнам, Таиланд) [65, 196, 216]. Эта первая волна гриппа H5N1, вызванная его вирусным клейдом 1, сопровождалась тяжелыми респираторными инфекциями и высокой летальностью. Вторая волна гриппа А (H5N1) в середине 2004 г. характеризовалась еще большей летальностью. Третья волна в конце 2004 г. – начале 2005 г., затронула не только Вьетнам и Таиланд, но и Камбоджу [51]. Далее в течение 2005-2007 гг. грипп H5N1 распространился в виде четвертой и пятой волн практически по всему миру: Азербайджан, Турция, Египет, Ирак, Китай, Вьетнам, Таиланд, Лаос, Нигерия, Бирма, Пакистан [30, 35]. Возбудитель этих волн относился к клейду 2 вируса А (H5N1). Смертность составляла 62%. Волны гриппа среди людей совпадали по времени с мощными эпизоотиями А (H5N1) среди домашних птиц. Средний возраст заболевших составлял 18 лет (от 3 месяцев до 75 лет). 89% случаев отмечены у лиц младше 40 лет, а наибольшая смертность – у людей 10-19 лет. Она наступала в промежутке 2-21 дней после появления клинических признаков болезни (в среднем – 9 дней). Всего 1997-2007 гг. зарегистрировано 683 случая с летальным исходом [52]. Не отмечено каких-либо расовых или гендерных отличий в поражении людей гриппом H5N1 [68].

Исследования показали, что большинство заражений людей гриппом А (H5N1) происходило путем передачи «птица-человек» при прямом или косвенном контакте с больными или мертвыми домашними и дикими птицами: уход, потребление в пищу и посещение птичьих рынков [37, 74]. У четверти больных такие контакты не обнаружены.

По клиническим данным [37], большинство заболеваний сопровождалось высокой температурой, кашлем, коротким дыханием, проявлением диспноэ и

развитием пневмонии. Около трети случаев сопровождались диареей. У госпитализированных тяжелых больных диагностировали септический шок, респираторные и мультиорганные поражения, реактивный гемофагоцитоз.

В подавляющем большинстве случаев этиология гриппа H5N1 у заболевших основывалась на данных RT-PCR с применением H5-специфических праймеров [31]. В качестве биологического объекта исследования использовали назофарингеальные, назальные и бронхоальвеолярные смывы. Диагностика с помощью парных сывороток крови применялась весьма ограничено из-за трудностей в отборе второй сыворотки спустя 21 день после начала инфекции.

В 2006-20015 гг. продолжали регистрироваться спорадические случаи заболевания людей гриппом A(H5N1) [33, 34, 110, 192]. Например, с 1 ноября 2014 г. по 30 апреля 2015 г. в мире было зарегистрировано 165 таких случаев, из которых 48 оказались смертельными [33]. Особенно рост заболевания отмечен в Египте [122, 158]. Увеличения числа заболеваний гриппом H1N1 в 2014-2015 гг. связывают с появлением нового клайда 2.2.1.2 вируса H5N1. Этот клайд, выделенный в Египте от домашних птиц, быстро распространился и стал доминантным [44].

Механизм распространения вируса гриппа A (H5N1) среди людей тесно связан с глобальной миграцией диких птиц и трудовой деятельностью, связанной с домашними птицами [52]. Доказан водный путь передачи патогенных птичьих вирусов гриппа A [71]. Однако не получены убедительные доказательства передачи вируса A (H5N1) от человека к человеку [199].

По решению ВОЗ в мире проводится строгий учет заболевания людей гриппом H5N1 по следующим четырем категориям: обследуемые, подозреваемые на заболевание, лица с вероятной инфекцией и люди с подтвержденным диагнозом [29].

2.1.3 Иммунизация людей вакцинами из вирусов с гемагглютинином H5

Разработка резервных вакцин против вируса гриппа A (H5N1) включена в глобальный план ВОЗ по вакцинопрофилактике потенциально пандемических вирусов гриппа A [27]. Наибольшее число исследований в этой области посвящено созданию именно вакцин H5N1. Использование для конструирования таких вакцин

высокопатогенных вирусов H5N1 оказалось весьма затруднительным из-за их летального воздействия на куриные эмбрионы. Поэтому предпочтение отдавалось низкопатогенным штаммам вируса А (H5N1) [149]. Другая трудность заключалась в антигенном дрейфе вируса с начала его циркуляции в 1997 г. в виде появления новых клонированных. В настоящем разделе приводятся только вакцины H5N1, прошедшие первую фазу клинических испытаний на людях.

Инактивированная вакцина. Первая яичная субвирионная ИГВ создана на базе штамма А/гусь/Гонконг/1996 (H5N1) – возбудителя первой волны заболеваний среди людей [45]. Далее в 2005 г. испытана моновалентная яичная вакцина А/утка/Сингапур/97 (H5N3). Этот штамм имел антигенное сродство с штаммом А/гусь/Гонконг/1996. В 2006 г. апробирована яичная субвирионная моновалентная ИГВ, приготовленная из более позднего клона – А/Вьетнам/1203/2004(H5N1) [96]. Прошли испытания цельновирионная яичная адъювантная моновалентная ИГВ А/Вьетнам/1194/2004 [128], цельновирионная клеточная (культура клеток Vero) моновалентная ИГВ А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) [79] и рекомбинантная по гемагглютинирующему Н5 моновалентная вакцина А/Гонконг/156/197 (H5N1).

Все перечисленные вакцины были безвредны, но они страдали существенным недостатком – низкой иммуногенностью по данным РТГА и РМН [45, 131]. Более или менее удовлетворительная иммуногенность достигалась только при использовании очень больших доз антигена (до 90 мг/мл), либо трехкратной прививкой, либо применением адъювантов.

Живые вакцины. В США прошла испытания на волонтерах моновалентная ЖГВ (H5N1), приготовленная обратногогенетическим способом из двух вирусов гриппа А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) и А/Гонконг/213/2003 (H5N1) [108]. Вакцинные штаммы содержали гены наружных белков (НА и NA) от диких вирусов и 6 генов внутренних белков от донора аттенуации А/Энн/Арбор/6/60(H2N2). Дозы препаратов составляли от 10^{6,7} до 10^{7,5} TCID₅₀. В целях безопасности НА от диких вирусов был модифицирован по cleavage-сайту. Определяли прирост титров сывороточных антигемагглютинирующих (РТГА) и вируснейтрализующих (РМН) антител, сывороточных IgA- и IgG-антител, и локальных IgA-антител(ИФА).

Вакцины были ареактогенны, но и слабо иммуногенны (от 10 до 33% конверсий антител).

В России осуществлена первая фаза клинических испытаний реассортантной моновалентной ЖГВ (H5N2), содержащей два гена наружных белков (НА и NA) от низкопатогенного вируса гриппа А/утка/Потсдам/1402-6/86 (H5N2) и семь генов внутренних белков от донора аттенуации А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) [62, 161]. При полной безвредности этот препарат показал более высокую иммуногенность – от 30 до 60%, конверсии антител в РТГА, РМН, ИФА к вакцинному штамму H5N1 и 21-31% конверсий антител к более позднему штамму А/Индонезия/05/2005 (H5N1).

Комбинированная стратегия вакцинации. В последние годы для вакцинации людей против потенциально пандемического вируса H5N1 предложена так называемая «комбинационная стратегия» [131]. Она основана на предвакцинальной иммунизации (праймировании) прививаемых лиц одной вакциной для достижения усиленного (бустированного) иммунного ответа на последующее введение другой вакцины. В отношении к потенциально пандемическим вирусам такая стратегия привлекает внимание по трем причинам. Первая – поскольку производственные возможности для быстрого приготовления новых вакцин ограничены, любая дополнительная стратегия, основанная на парном применении уже имеющихся вакцин, вызывает заслуженный интерес. Вторая – режим вакцинации с помощью комбинации наличествующих препаратов весьма полезен в случае отсутствия или недостаточного количества нужного типа вакцины. Третья – комбинационная стратегия вакцинации может потенцировать иммунный ответ до оптимального уровня за счет формирования при праймировании долговременной иммунологической памяти к бустирующей вакцине. Такая память может усиливать и ускорять иммунный ответ на буст-вакцину, а также расширять его спектр.

Эффективность режима «праймирование-бустирование» доказано при вакцинации против ВИЧ, туберкулеза, малярии [85, 125, 131, 150, 176, 209]. Изучался вопрос и в отношении прививок против потенциально

пандемических вирусов гриппа А. В подавляющем большинстве случаев это была вакцинация против вируса гриппа А (H5N1). Так, использование праймирующей адьювантной ИГВ (H5N3) с целью бустирования иммунного ответа у людей на адьювантную ИГВ (H5N1) не дало ожидаемого эффекта из-за низкой иммуногенности первой, тогда как праймирующая адьювантная ИГВ H3N2 бустировала гуморальный иммунный ответ на ИГВ (H5N1) [149]. Бустирование гуморального ответа на ИГВ (H5N1) отмечено при применении в качестве праймирующей рекомбинантной H5 вакцины [92], ДНК-вакцин H5N1 и адьювантной векторной вакцины H5N1 [124].

Сравнительно недавно американскими авторами в качестве праймирующей вакцины использована ЖГВ H5N1 [190]. Ими показано, что отдаленное во времени (5 лет назад) праймирование волонтеров этой вакциной мощно бустировало продукцию сывороточных антител после прививки ИГВ H5N1. Это послужило доказательством способности данной ЖГВ стимулировать у людей долговременную иммунологическую память к вирусу H5N1.

2.1.4 Иммунологические обследования людей

При заболевании гриппом H5N1 у людей наблюдалась дисрегулированность цитокинового и хемокинового иммунных ответов в виде гиперпродукции $TFN\alpha$, $IL-6$, $IL-8$, $IFN\gamma$, $MCP-1$, MIG и снижения уровня Т-лимфоцитов в периферической крови [73, 141]. При этом не отмечено каких-либо существенных отличий в концентрации перечисленных факторов иммунитета у выздоровевших и умерших людей [73].

Проводимые в 1997 г. сероэпидемиологические исследования (РТГА) среди 1525 работников птицеферм в Гонконге, показали наличие антител к вирусу гриппа А (H5N1) у 10% обследованных [50]. Из 11 серологически подтвержденных случаев гриппа H5N1, выявленных в 1997 г., 7 протекали со средней тяжестью, а у четырех – по тяжелому или фатальному типу [56, 212]. Из весьма ограниченных сероэпидемиологических данных по вирусам гриппа H5N1 2005 – 2007 гг., известно, что серологически подтвержденные заболевания средней тяжести или бессимптомные инфекции были очень редки [28, 43, 107]. При серологических

обследованиях людей из Азиатского региона в РТГА антитела к вирусу H5N1 не были обнаружены [102].

Нам не удалось выявить целенаправленных работ по исследованию состояния коллективного иммунитета населения к вирусу H5N1, включавших одновременно все три основных компонента адаптивного иммунитета: сывороточные антитела, локальные антитела и вирусспецифические Т-клетки.

2.2 Потенциально пандемический антропонозный вирус гриппа А(H2N2)

Этот вирус является возбудителем пандемии 1957-1968 гг. Как и вирус H5N1, он входит в список потенциально пандемических вирусов гриппа, составленный ВОЗ [26].

2.2.1. Общие сведения о вирусе гриппа А(H2N2)

После сорокалетней циркуляции вируса гриппа А (H1N1) (1918-1957 гг.), в феврале 1957 г. в одной из провинций Китая от заболевших людей был выделен новый подтип вируса гриппа А(H2N2) с полностью обновленными поверхностными белками [89].

Возбудитель пандемии 1957 г. А/Сингапур/1/57(H2N2) имел фрагменты внутренних генов от птичьих вирусов того же подтипа [109]. Более поздний филогенетический анализ показал, что гены гемагглютининов H1, H2 и H5 близки по структуре и относятся к одной группе 1 [87, 167, 188]. В процессе циркуляции в 1957-1968 гг. все 8 генов вируса гриппа А (H2N2) подверглись расходящейся эволюции [129]. В результате штаммы, изолированные в конце периода циркуляции разделились на два клады (I и II). Сравнительно короткий период циркуляции вирусов гриппа H2N2 (11 лет) объясняют сниженной способностью этих вирусов мутировать в области сайтов гликозилирования гемагглютинина [174, 182]. Показана способность вирусов H2N2 и H3N2 к реассортации [129].

Вирусы гриппа с гемагглютинином H2 продолжают циркулировать среди птиц [180]. Это создает угрозу появления новых реассортантов между штаммами «птичьих» H2 и циркулирующих среди людей вирусов гриппа А, как это случилось в пятидесятых годах во время пандемии азиатского гриппа [91, 133].

В 1980 г. в Ленинграде зафиксирована вирусологически и серологически подтвержденная вспышка гриппа А (H2N2) среди детей организованного коллектива [6].

В пандемию гриппа H2N2 1957-1968 гг. была впервые организована и применена система глобального наблюдения за гриппом, включающая регистрацию летальных случаев, выделение и идентификацию штаммов, иммунологические исследования. Система опиралась на два Всемирных центра, ориентированных на изучение гриппа (Лондон и Мельбурн), и на сеть национальных центров, в том числе и в СССР (Москва и Ленинград). На сегодняшний день эталонный штамм А/Япония/305/57(H2N2) внедрен в работу около четырех тысяч лабораторий для проведения этиологических и иммунологических исследований в 18 странах [148, 175].

Недавно нами в исследовании *in silico* продемонстрировано существенное эпитопное отличие NP современных вирусов гриппа А от вирусов H2N2 1957 года выделения [9].

2.2.2 Пандемия гриппа А (H2N2) 1957-1968 гг. и вакцинация людей против этого возбудителя

В течение марта-июня 1957 г. вирус гриппа А/Сингапур/1/57(H2N2) распространился из Китая по всему миру. Он был назван «Азиатским гриппом». В пандемии 1957-1968 гг. погибло около двух миллионов людей, смертность составила 0,67% [202]. Как и «Испанский грипп» H1N1 1918 г., вирус H2N2 поражал преимущественно детей и людей активного возраста, и в гораздо меньшей степени лиц старше 65 лет [172]. В целом социальные и экономические последствия пандемии гриппа А (H2N2) 1957-1968 гг. были значительно слабее этих последствий в период пандемии гриппа А (H1N1) 1918-1920 гг. Недавнее исследование по историческому анализу смертности от гриппа H2N2 в 36 странах показало, что она составила 1,9 человека на 10000 населения [202].

В период пандемии гриппа H2N2 ВОЗ была создана не только глобальная система наблюдения, но и разработаны подходы к современной стратегии противогриппозной вакцинации. Было показано, что только массовая иммунизация

с охватом в 50-70% населения может снизить интенсивность эпидемического процесса [100]. Кроме того, были выявлены возрастные и профессиональные группы повышенного риска, нуждающиеся в первоочередной вакцинации: дети, люди старше 60 лет, учителя, врачи [172]. В мировом масштабе осуществлялась вакцинация ИГВ H2N2, а в СССР еще и первыми вариантами пассажных ЖГВ H2N2.

В соответствии с современным планом ВОЗ [27] разрабатываются новые вакцины против потенциально пандемического вируса гриппа А (H2N2). Испытаны на волонтерах 18-30 лет два вакцинных штамма для ИГВ А/Сингапур/1/57(H2N2) – цельновирioнная и сплит-вариант [99]. Изучали дозозависимый эффект (от 1,9 до 15 мг НА на дозу) и кратность прививки, а также влияние адьюванта (гидроокись алюминия). Авторы пришли к выводу, что для достижения оптимального результата необходима двухкратная прививка цельновирioнной адьювантной вакциной.

В 2008 г. прошли первую фазу клинические испытания две реассортантные моновалентные ЖГВ H2N2 – одна в США [189] и одна в России [104].

Вакцинный штамм аттенуированной ЖГВ имел все шесть генов внутренних белков от донора аттенуации А/Энн/Арбор/6/60 (H2N2) и 2 гена наружных белков от вируса гриппа А/Япония/57 (H2N2). Вакцина оказалась безвредной, но низко иммуногенной из-за слабой репликации вакцинного штамма в верхних отделах дыхательного тракта [189].

В России в 2014 г. осуществлено испытание на волонтерах отечественной моновалентной реассортантной ЖГВ (H2N2) [104]. В качестве донора аттенуации применяли штамм А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). В состав вакцинного штамма входило 2 гена наружных белков от дикого вируса гриппа А/Калифорния/1/66 (H2N2) и 6 генов внутренних белков от донора аттенуации. Вакцина была ареактогенна и показала более высокие иммуногенные свойства по сравнению с американской ЖГВ.

Поскольку вирус H2N2 имеет высокий потенциал к возвращению в циркуляцию среди людей, ряд экспертов предлагает провести глобальную иммунизацию населения разработанными вакцинами [146, 184].

2.2.4. Иммунологические обследования людей

Иммунологические данные о вирусах H2N2, в сравнении с другими подтипами, весьма ограничены. Проведение в 1957-1968 гг. сероэпидемиологических исследований (титра антител в РТГА), установили два важных факта. Первый из них – вирусы H2N2 уже имели пандемическое распространение в конце 19 века. Об этом свидетельствовало обнаружение только у людей старше 65 лет антител к вирусу H2N2 в образцах сывороток крови, отобранных до 1957 г. [105]. Вторым фактом – в 1957 г. титры антител к предыдущему подтипу H1N1 тесно коррелировали с защитой от нового подтипа H2N2 [2, 8]. Данный факт послужил первым доказательством существования гетеросубтипического иммунитета у людей.

Многолетние (1976-1986) наблюдения за уровнем антител в РТГА к вирусу гриппа А/Сингапур/1/57 (H2N2) у разных возрастных групп населения Ленинграда от 1 до 80 лет [18] показали, что эти антитела обнаруживаются только у лиц, ранее контактировавших с вирусами H2N2 в 1957-1968 гг.

Значительно позднее (2012 г.) осуществлено сходное исследование, включающее тестирование антител в РТГА и РМН с разными сериями иммуноглобулинов из Японии и США, приготовленных в 1993-2010 гг. [119]. В качестве антигенов, использовали штаммы вируса H2N2, выделенные в 1957 и 1965 гг. В общей сложности серии иммуноглобулинов включали сыворотки крови от более чем 10000 здоровых доноров. Все серии содержали антигемагглютинирующие и вируснейтрализующие антитела, соответственно, в титрах 1:32-1:128 (РТГА) и 1:80-1:5120 (РМН). Однако, авторы не могли проанализировать полученные результаты в возрастном аспекте, что резко снижает их практическую ценность.

В периферической крови людей 1950-1968 гг. рождения гибридной технологией выделены моноклональные антитела к солюблизованному

гемагглютинирующую вирус гриппа А/Япония/305/57 (H2N2) [116]. Эти антитела реагировали в РТГА и РМН с консервативными доменами гемагглютинина H2, расположенными в его головке и ножке (stem-регион), и защищали мышей от заражения диким вирусом H2N2. Высказано мнение, что стимуляция таких кроссреактивных вируснейтрализующих антител к консервативным участкам гемагглютинина H1 в период циркуляции вирусов H1N1 в 1918-1957 гг. могло играть существенную роль в защите взрослых и пожилых людей от вируса H2N2 в 1957 г, а также элиминации вирусов H1N1 [213].

2.3. Актуальные вопросы формирования адаптивного иммунитета к вирусам гриппа А

К главным адаптивным факторам противовирусного иммунитета относят: системный гуморальный иммунитет (циркулирующие в крови сывороточные антитела), мукозальный гуморальный иммунитет (локальные IgA-антитела секретов верхних дыхательных путей) и Т-клеточный иммунитет (хелперные CD4+ Т-клетки и цитотоксические CD8+ Т-клетки) [25].

Протективность сывороточных и локальных антител доказана в 70-е 80-е годы прошлого века на материале, полученном в длительно наблюдаемых коллективах или при заражении волонтеров дикими штаммами [7, 13, 14]. Установлены защитные титры сывороточных антигемагглютинирующих антител 1:40 и выше [7], и локальных IgA-антител 1:64 и выше [13]. Проведено многофакторное изучение особенностей формирования локального поствакцинального и постинфекционного гуморального иммунного ответа [3, 5, 154]. Доказано, что авидность антител отражает протективность людей к вирусам гриппа А(H1N1) и А(H3N2) [19]. Установлена способность сезонной ЖГВ повышать авидность индуцируемых ею локальных IgA антител [4, 153]. В этом качестве они превосходят ИГВ [11, 19, 20].

В настоящем разделе обзора представлены литературные источники, освещающие новые актуальные направления в изучении противогриппозного иммунитета: (i) протекция Т-клеточного иммунитета, (ii) гетеросубтипический Т- и В-клеточный иммунитет, (iii) формирование иммунологической Т- и В-клеточной

памяти, (iv) влияние геномных мутаций на иммунный ответ к вирусам гриппа А (генетическая иммунология). Эти разделы включены в обзор литературы потому что все они напрямую касаются собственных исследований диссертации.

2.3.1. Роль Т-клеток в защите людей от гриппа А

Если участие гуморального иммунитета в защите от гриппа А является давно доказанным фактом, то сведения о протективной роли Т-клеточного иммунитета получены лишь в последние годы в связи с разработкой методов, позволяющих тестировать в ПЦ или ELISPOT вирусспецифические Т-лимфоциты по их продукции различных цитокинов (чаще всего $IFN\gamma$) при стимуляции культур этих клеток теми или иными вирусными антигенами [75].

В работах по экспериментальному челленджу людей вирусами гриппа А (H1N1) и А (H3N2), у которых отсутствовали антитела к этим возбудителям, показано существование обратной зависимости между уровнем вирусспецифических цитотоксических $CD8^+$ Т-клеток, с одной стороны, и вирусовыделением и тяжестью воспроизведенной гриппозной инфекции, с другой [183, 198, 206]. Эти данные явились ключом к пониманию роли данных клеток в снижении тяжести заболеваний гриппом А на популяционном уровне.

В другом исследовании доказано существование обратной зависимости между исходными уровнями (%) вирусспецифических $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток у детей и взрослых, с одной стороны, и выраженностью клинических симптомов гриппа при естественном инфицировании вирусом А(H1N1)pdm 2009 в эпидемию 2009-2010 гг., с другой [206].

2.3.2 Т-клеточный иммунный ответ при иммунизации людей гриппозными вакцинами

Стратегия противогриппозной вакцинации пока еще не нацелена на конструирование вакцин с учетом их способности индуцировать клеточный иммунный ответ. Этот вопрос находится в начальной стадии изучения.

В работах по исследованию вирусспецифического Т-клеточного иммунного ответа в периферической крови людей, привитых сезонными американскими ЖГВ и ИГВ [16, 38, 86, 97, 116, 123, 166, 206], установлено:

1. ЖГВ намного успешнее ИГВ стимулирует продукцию $IFN\gamma CD4+$ и $IFN\gamma CD8+$ Т-клеток.
2. $IFN\gamma CD4+$ и $IFN\gamma CD8+$ Т-клеточный иммунный ответ на ЖГВ зависит от исходного уровня этих лимфоцитов (обратная зависимость).
3. Молодые и пожилые лица не отличаются по частоте и интенсивности $IFN\gamma CD4+$ Т-клеточного ответа.
4. ЖГВ индуцирует $CD4+$ и $CD8+$ Т-клеточный иммунный ответ по первичному типу, то есть с формированием иммунологической памяти, сопровождающимся увеличением уровня $IFN\gamma$ – продуцирующих клеток и экспрессией хемокинов, вовлеченных в формирование иммунологической памяти: CCL-5, CCL-2, CCL-8 и CCL-10.
5. Предсуществующие вируснейтрализующие антитела снижают $CD8+$ Т-клеточный иммунный ответ на ИГВ.
6. Существует прямая корреляционная зависимость между $CD4+$ Т-клетками и титрами вируснейтрализующих антител.

Кроме сезонных вакцин, Т-клеточный иммунный ответ изучен и при иммунизации отечественными резервными ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа А: H2N2 [104], H7N3 [165] и H7N9 [163]. Все они стимулировали у части людей (от 10 до 40%) увеличение вирусспецифических $CD4+$ и $CD8+$ Т-клеток.

2.3.3. Иммунологическая память у людей при гриппозной инфекции и вакцинации

В отличие от врожденного, приобретенный (адаптивный) иммунитет имеет два основополагающих признака: специфичность и иммунологическую память. Иммунологическая память отражает способность организма при повторной встрече с антигеном отвечать ускоренной, усиленной, расширенной и более длительной иммунной реакцией, по сравнению с первичным иммунным ответом.

Носителями данного феномена являются особые пулы В- и Т-лимфоцитов: В- и Т-клетки памяти.

В- клетки памяти несут четыре главных маркера: CD19, IgD, CD27 и CD38 [170]. В-клеточная память включает два типа В-лимфоцитов: длительно живущие антителосекретирующие плазматические клетки (эффекторная память) и В-клетки, которые являются предшественниками плазмоцитов и восполняют пул антителосекретирующих клеток при повторном контакте организма с антигеном или гомеостатически без антигенного стимула (центральная память) [136].

Селекция В-клеток памяти направлена главным образом в сторону выживания клонов высокоавидных антител [77]. В этой связи состояние В-клеточной иммунологической памяти оценивают по уровню высокоавидных антител.

Популяция Т-клеток памяти подразделяется на центральную (Т_{cm}) и эффекторную (Т_{em}) память [169]. Т_{cm} располагаются преимущественно в лимфатических органах и экспрессируют высокий уровень хемокиновых рецепторов хоминга CCR7 и CD62L. В отличие от наивных Т-лимфоцитов, Т_{cm} не экспрессируют CD45RA. Т_{em} не экспрессируют ни CD45RA, ни CCR7 [169, 205]. Т_{em}, находясь в периферических тканях, осуществляют немедленную защиту людей при реинфекции в течение короткого промежутка времени, в то время, как Т_{cm} обеспечивают пролонгированность иммунной защиты [169, 203]. Устойчивость Т-клеток памяти к апоптозу увеличивается за счет экспрессии Bcl-2 и Bcl-Xl.

Иммунологическая память людей при естественной гриппозной инфекции. Очень длительное (скорее всего пожизненное) сохранение у людей естественно приобретенной В-клеточной памяти подтверждается двумя фактами. Первый из них – существование феномена «первородного антигенного греха» [7]. Он заключается в способности организма при контактах с актуальными вирусами гриппа отвечать конверсиями сывороточных антигемагглютинирующих антител (РТГА) ко всем подтипам этого вируса, с которыми он встречался ранее в течение жизни [181]. Этот феномен детально изучен А.Н.Найхиным, и результаты обобщены в его диссертации на соискание ученой степени доктора наук (1986).

Второй факт – природный эксперимент с рециркуляцией вируса H1N1 в 1977 после двадцатилетнего перерыва. В этот период лица, встречавшиеся с вирусом данного подтипа во время его предыдущей циркуляции в 1918 – 1957 гг., болели клинически выраженным гриппом во много раз реже, чем люди, родившиеся после 1957 года. Праймированные лица переносили преимущественно иннаппарантные формы инфекции, сопровождавшиеся усиленной и ускоренной продукцией сывороточных антител (РТГА) [6, 18, 21].

В наше время опубликованы две работы, посвященные изучению продукции Т-клеток памяти у людей, переболевших гриппом А. В работе американских авторов [130] показано, что после перенесенного гриппа А (H1N1) вирусспецифические CD4+ и CD8+ Т- клетки, сохраняются в периферической крови заболевших. При этом среди CD4+ Т-клеток обнаружены лимфоциты, несущие маркеры Tcm. В другой работе французских авторов [48] установлено существование обратной связи между исходными уровнями вирусспецифических CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти и тяжестью перенесенного гриппа А(H1N1)pdm2009 [48]. Такая же связь обнаружена между тяжестью инфекции и авидностью сывороточных антигемагглютинирующих антител [48, 194, 195]. В этой связи следует отметить, что летальные случаи гриппа А(H1N1)pdm 2009 были ассоциированы с продукцией низкоавидных антител [142].

Иммунологическая память людей при иммунизации гриппозными вакцинами.
Вся вакцинология основана на феномене иммунологической памяти, то есть на способности вакцины индуцировать Т- и В- клеточную память. Механизм такой защиты связан с ускоренной и более длительной продукцией факторов адаптивного иммунитета при последующем контакте с «диким» вирусом [53]

Накоплены сведения о преимуществе американской сезонной ЖГВ перед аналогичной ИГВ в стимулировании «антигенного греха» [38], высокоавидных антител [11, 19, 20, 153, 169], вирусспецифических CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти [153, 171]

По данным французских исследователей, спустя год после иммунизации взрослых лиц американская ЖГВ А (H1N1)pdm2009 у них сохранились IFN γ +CD4+

и IFN γ +CD8 $^+$ Т-клетки памяти, проявлявшие специфичность к вакцинному штамму [48]. При этом отмечены отличия в формировании постинфекционной и поствакцинальной иммунологической памяти, заключающиеся в разной интенсивности экспрессии на Т-клетках молекул хоминга CD49 и CD107. Американская сезонная ЖГВ стимулировала у детей 5-9 лет продукцию CD4 $^+$ и CD8 $^+$ Т-клеток памяти [214].

Сведения о способности приготовленных в США сезонных ИГВ стимулировать у людей продукцию вирусспецифических CD4 $^+$ и CD8 $^+$ Т-клеток памяти противоречивы. По одним данным, ИГВ не обладают этим свойством [214], по другим, такое качество есть, но оно слабо выражено [135]. В одной работе приведены данные об отсутствии стимулирующего эффекта в отношении этих клеток при введении взрослым лицам сезонных ИГВ (США) и ЖГВ (США) [97].

Продолжительность сохранения иммунологической памяти у людей. Этот вопрос является ключевым в вакцинальной иммунологии [53]. По-видимому, постинфекционные вирусспецифические В-клетки памяти сохраняются в организме в течение очень долгого времени, если не пожизненно. Об этом свидетельствуют два факта. Первый – лица, пережившие пандемию гриппа А (H1N1) 1918 г., спустя 90 лет остались серопозитивными к реконструированному возбудителю данной пандемии [211]. Второй – серопозитивность людей, перенесших грипп А (H2N2) в конце 19 века [83]. На момент обследования в 1957 г. им было 50-90 лет.

В отношении продолжительности сохранения поствакцинальной В-клеточной памяти к вирусам гриппа А вопрос менее ясен. Во всяком случае, иммунизация волонтеров американской ЖГВ в режиме «праймирование-бустирование», показало наличие у привившихся пролонгированной вирусспецифической В-клеточной памяти, сохранившейся не менее 5 лет [190].

Сведения о сроках пролонгации вирусспецифических CD4 $^+$ и CD8 $^+$ Т-клеток в литературе единичны [137, 138]. В то же время исследования по вакцинации людей против желтой лихорадки и оспы свидетельствуют, что вирусспецифические CD8 $^+$ Т-клетки персистируют от 10 лет [39] до 50 лет [139].

Однако уровень этих клеток резко снижается через 2-3 года после прививки сезонной ИГВ [137].

2.3.4. Гетеросубтипический иммунитет людей к вирусам гриппа А

В последнее десятилетие в связи с потенциальной опасностью возникновения новых пандемий, а также разработкой подходов к созданию универсальных вакцин против всех подтипов вируса гриппа А [156, 181], пристальное внимание ученых привлекает проблема гетеросубтипического иммунитета [17, 22, 94]. Под этим термином подразумевается иммунитет, генерированный одним подтипом вируса гриппа А против других подтипов.

В экспериментальных исследованиях по заражению мышей различными подтипами вируса гриппа А с последующими перекрестными челленджами животных этими подтипами, установили три важных факта [22, 94]:

1. Носителями гетеросубтипического иммунитета являются вируснейтрализующие антитела и Т-клетки фенотипов CD4⁺ и CD8⁺.
2. Гетеросубтипический иммунитет снижает патологические проявления гриппа и обеспечивает частичную защиту от летального челленджа.
3. В гетеросубтипическом иммунитете задействованы преимущественно антитела и Т-клетки, специфичные к высококонсервативным внутренним белкам вириона: NP и M1.

Первыми прямыми доказательствами существования гетеросубтипического иммунитета у людей получены в начале пандемии гриппа H2N2 в 1957 г. и гриппа H3N2 в 1968 г. Было показано наличие прямой зависимости между защищенностью населения и наличием антител к предшествовавшему пандемическому варианту, то есть к H1N1 и H2N2 соответственно [90, 94, 160].

В последние годы особый интерес проявляется к кроссреактивным антителам к консервативным иммунодоминантным эпитопам, обнаруженным в ножке (stem-регион) и глобулярном домене головки гемагглютинаина различных подтипов вируса гриппа А [82, 114, 115].

Недавно из крови здоровых доноров гибридной технологией выделены моноклональные антитела к консервативному участку головки гемагглютинаина,

перекрестно реагирующие с вирусами H2N2 и H3N2 [116]. Такие же моноклональные антитела, изолированные из крови взрослых людей, проявляли специфичность к stem-региону гемагглютинина. Они нейтрализовали вирусы H5N1, A (H1N1)1918 г. и A (H1N1) 2009 г. [187, 207], вирусы H3N2 и H5N1 [66], вирусы с гемагглютинидами H1, H2, H5, H3, H7, H10 [67] и вирусы H3N1 и H7N9 [80]. Все авторы, занимающиеся этой проблемой, придерживаются мнения о перспективности таких исследований для создания универсальной вакцины и терапии тяжелых случаев гриппозной инфекции, вызванных птичьими вирусами гриппа А.

Гетеросубтипический гуморальный иммунитет представляют и вируснейтрализующие антитела к консервативным участкам внутренних белков вируса гриппа А: M1 [147] и NP [210]. Предпринята попытка иммунизировать людей белковым комплексом NP+M1 в сочетании с моноклональными антителами для усиления цитотоксического иммунного ответа [127]. Такая попытка осуществлена и в отношении вакцинации людей NP [84].

Гетеросубтипический Т-клеточный иммунитет связан с узнаванием Т-клетками иммуногенных пептидов высоко консервативных сайтов внутренних белков вириона [81]. Большинство антигенных пептидов, узнаваемых CD8⁺ Т-клетками, презентруются из белков NP, M1 и PB1 [93, 208]. Кроссреактивность CD8⁺ Т-клеток у людей продемонстрирована в отношении вирусов H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N3 и H7N9 [15, 95, 101, 117, 156, 162, 163, 201]. Кроссреактивные CD8⁺ клетки обнаружены в крови взрослых людей [159]. Они проявляют специфичность к белкам M1, NP и NA вирусов с гемагглютинидами H1, H2 и H3.

2.3.5. Мутации в генах внутренних белков вирусов гриппа А и иммунный ответ

В инфекционной иммунологии новым перспективным направлением является изучение формирования постинфекционного и поствакцинального иммунного ответа в зависимости от генетических особенностей возбудителя и хозяина (генетическая иммунология) [1]. Известно, что антигенный дрейф вирусов гриппа А определяется появлением точечных мутаций в генах гемагглютинина и нейраминидазы под влиянием коллективного иммунологического пресса. Такие мутации (escape- мутации) позволяют избегать активного воздействия на новый дрейфовый вариант

вируснейтрализующих антител к перечисленным белкам предшествующего штамма [118]. Однако в последние годы показано, что антигенный дрейф, хотя и более медленный, характерен для генов всех внутренних белков вириона, особенно для гена NP [9, 17], то есть, главного белка, запускающего цитотоксический иммунный ответ. В гене данного белка обнаружены свои escape-мутации, расположенные в иммунодоминантных сайтах [49]. В этой связи вполне правомерно возникает вопрос, могут ли отражаться мутационные изменения в генах внутренних белковых структур вириона на развитии иммунного ответа? Поскольку осуществление подобных исследований на людях весьма затруднительно по этическим соображениям, в России и США были проведены опыты на мышах по заражению животных штаммами, созданными методом обратной генетики, содержащими различные мутации в генах внутренних белков PB1, PB2, PA и NP [10, 185, 215]. Этот же вопрос изучен и на реассортантных штаммах [23, 154]. В этих опытах использовали: (i) патогенный для мышей вирус wt A/PR/8/34(H1N1), (ii) аттенуированный вирус A/PR/8/34(H1N1), имевший два гена наружных белков от патогенного вируса и 6 генов внутренних белков от донора аттенуации A/Ленинград 47/57 (H2N2), (iii) вирус A/PR/8/34(H1N1) с набором мутаций в полимеразных генах, характерных для того же донора аттенуации, (iv) вирусы A/PR/8/34(H1N1) с мутациями в гене PB2 от американского донора аттенуации A/Ann/Arbor/6/60 (H2N2).

В целом, эти исследования показали, что мутационные изменения в полимеразных генах PB1, PB2 и PA сопряжены не только с аттенуацией вируса гриппа [24], но и с изменением собственных показателей гуморального и Т-клеточного иммунного ответа мышей на вводимые генномодифицированные варианты вируса A/PR/8/34(H1N1).

2.3.6. Плазмобластные поликлональные антитела (PPab), секретируемые Т-лимфоцитами *in vitro*

Обычно иммуногенность гриппозных вакцин оценивают по количеству поствакцинальных конверсий сывороточных антител, фиксируемых в РТГА, РМН и 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 [20, 70]. В то же время имеются и альтернативные данные об отсутствии или весьма слабом влиянии сывороточных антител на противогриппозную протекцию [197]. Существует способ определения антител не в сыворотках крови, а в надосадках культур мононуклеаров периферической крови, то есть поликлональных антител, секретируемых зрелыми плазмобластными В-лимфоцитами *in vitro* P₉ab [98]. Этот подход апробирован при изучении поствакцинального иммунного ответа на прививку людей против столбняка [85], холеры [155], брюшного тифа [176]. Кроме того, он применен при оценке иммуногенности американской сезонной ИГВ [98].

Циркулирующие сывороточные и секретируемые P₉ab отличаются по качественному составу [98]. 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 дифференцируются 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 регионы и ткани организма [120, 121]. Популяция клеток, мигрирующая в костный мозг, становится плазматическими клетками, секретирующими сывороточные антитела [25, 47]. 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 предсуществующих

штаммспецифических и перекрестно реагирующих антител к консервативным иммуноэпитомам вируса [98].

Заключение

Анализ приведенных в обзоре источников литературы позволяет представить следующие обобщения и выводы.

ВОЗ относит вирус гриппа А птиц (H5N1) и антропонозный вирус гриппа А (H2N2) к потенциально пандемическим. Имеется значительный объем данных по эпидемиологии, клинике и генетике вируса гриппа А(H5N1). Согласно плану ВОЗ приготовлены резервные вакцины против вирусов гриппа А (H5N1) и А (H2N2), прошедшие клинические испытания на волонтерах: сплит, субвирионные и цельновирионные ИГВ, рекомбинантная по гемагглютинину H5, реассортантная ЖГВ на основе российского и американского доноров аттенуации. Все эти вакцины были безвредны, но, по сравнению с сезонными вакцинами, слабо иммуногенны по частоте и интенсивности индукции сывороточных антител. Для защиты от гриппа А (H5N1) предложено использовать и гетерологичные вакцины: А (H5N3) в США и А (H5N2) в России. С целью усиления поствакцинального иммунного ответа на ИГВ H5N1 проведен ряд исследований на волонтерах (США) по использованию комбинированной вакцинации в режиме «праймирование-бустирование». В качестве праймирующих вакцин в США применяли: ИГВ H3N2, рекомбинантную по гемагглютинину H5, аденовирусную векторную, ЖГВ H5N1.

По сравнению с объемом эпидемиологических, клинических и молекулярно-генетических данных, иммунология вирусов гриппа А (H2N2) и А (H5N1) изучена значительно слабее.

Сероэпидемиологические исследования 70х – 80х годов прошлого века показали наличие сывороточных антител к вирусу гриппа А (H2N2) только у лиц, контактировавших с ним в 1957 – 1968 гг. Сывороточные антитела к вирусу гриппа А (H5N1) у населения всех возрастов, проживающего вне зоны его распространения, не выявлялись. Гибридной технологией из крови людей выделены кроссреактивные моноклональные антитела, реагирующие с

консервативными эпитопами гемагглютининов H5 и H2, а также кроссреактивные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, специфичные к NP вирусом гриппа А (H5N1) и А (H2N2). В нашей работе показана способность российской ЖГВ А (H2N2) стимулировать у волонтеров продукцию вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и локальных IgA-антител. У больных гриппом А (H5N1) отмечена цитокиновая и хемокиновая дисрегуляция в виде гиперпродукции TNF α , IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1.

Все приведенные выше данные касаются материалов первой и второй глав обзора литературы. В третьей заключительной главе представлены литературные источники по затронутым в настоящей диссертации актуальным вопросам иммунологии гриппа А. Доказана на людях протективность сывороточных антител и вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Сезонные ЖГВ имеют преимущество перед ИГВ в индукции у людей этих клеток, а также локальных IgA-антител, а также Т-клеточной иммунологической памяти, высокоavidных сывороточных и локальных антител. Имеются убедительные доказательства пожизненного сохранения у людей постинфекционной В-клеточной иммунологической памяти. Вопрос о сроках сохранения поствакцинальной иммунологической памяти к вирусам гриппа А остается открытым. Носителями гетеросубтипического иммунитета людей к различным подтипам вируса гриппа А являются кроссреактивные антитела к консервативным эпитомам гемагглютинина и кроссреактивные Т-клетки фенотипов CD4⁺ и CD8⁺, специфичные к белкам NP и M1. Доказано, что этот вид иммунитета снижает тяжесть инфекции и обеспечивает клиренс возбудителя из организма. Установлено наличие антигенного дрейфа белка NP вируса гриппа А, ответственного за стимуляцию цитотоксического иммунитета. В опытах с заражением мышей патогенным вирусом A/PR/8/34 (H1N1) и набором обратногогенетических штаммов с различными мутациями в генах его полимеразного комплекса (PB1, PB2, PA), показано влияние отдельных мутаций на количественные показатели гуморального иммунного ответа. В отличие от вируса А(H2N2), подобные исследования не проводились. Изучена способность ИГВ стимулировать продукцию плазмобластных поликлональных антител (PPAb), секретируемых *in vitro* В-лимфоцитами. В

отношении резервных вакцин такие исследования отсутствуют. В экспертном сообществе существует единодушное мнение об отсутствии представлений по оптимальной оценке иммуногенности резервных вакцин.

Анализ литературных данных позволил акцентировать внимание настоящей работы на изучении ряда нерешенных вопросов иммунологии вирусов гриппа А (H5N1) и А (H2N2):

1. Нет целенаправленных исследований по комплексному тестированию различных составляющих гетеросубтипического адаптивного иммунитета к вирусам А (H5N1) и А (H2N2) (системный, локальный, клеточный), формирующегося у населения в условиях современного эпидемиологического процесса. Полученные данные отражены в главе 4.1.

2. Нет четких критериев оценки иммуногенности резервных ЖГВ, позволяющих проецировать этот показатель на их протективность. Общепринятый метод включает только два показателя – число конверсий сывороточных антител в РТГА и процент лиц с защитными титрами этих антител. Другие факторы адаптивного иммунного ответа не учитываются. Этот вопрос изучен нами на примере комплексной оценки иммуногенности отечественной резервной ЖГВ А (H5N2) по количественным показателям таких факторов иммунной защиты, как сывороточные антитела, локальные антитела и Т-клетки иммунологической памяти (глава 4.2).

3. Имеется только одна работа по оценке на волонтерах прайм-буст вакцинации при введении американской ИГВ H5N1, спустя 5 лет после иммунизации ЖГВ H5N1. В нашем исследовании в качестве праймирующей и бустирующей вакцин были применены отечественные ЖГВ H5N2 и ИГВ H5N1 (глава 4.3).

4. Нет работ по изучению влияния мутационных изменений во внутренних белках потенциально пандемического вируса гриппа А(H2N2) на количественные и качественные характеристики иммунного ответа к этому возбудителю. Материалы по данному направлению представлены в главе 4.4.

3. Материалы и методы

3.1. Вакцины

Экспериментальные серии ЖГВ были изготовлены предприятием НПО «Микроген» из вакцинных штаммов, разработанных в отделе вирусологии имени А.А. Смородинцева ФГБНУ Института экспериментальной медицины. Штамм был получен методом классической реассортации и включал НА от патогенного вируса А/индюк/Турция/1/2005 (H5N1), а НА и все внутренние белки - от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) – генетическая формула 1:7.

ИГВ ОрниФлю® (Вакцина гриппозная инактивированная субъединичная адсорбированная) предоставлена НПО «Микроген». Суспензия для внутримышечного введения представляет собой поверхностные гликопротеины (гемагглютинин и нейраминидазу), выделенные из очищенных вирионов вируса гриппа А(H5N1), выращенного на куриных эмбрионах. Гликопротеины сорбированы на гидроксиде алюминия. Каждая доза вакцины (0,5мл) содержала 15 мкг гемагглютинина вируса гриппа А(H5N1)

3.2. Обследованные контингенты

Для исследования коллективного иммунитета к потенциально пандемическим вирусам гриппа А использованы фоновые образцы СК, СВДП и МПК у людей 18-49 лет, участвовавших в клинических испытаниях различных ЖГВ в 2000-2014 гг., а также лиц 18-85 лет, обследованных в 2011-2012 гг. в различных лабораторных центрах города по поводу диагностики соматических заболеваний.

Испытания ЖГВ H5N2 в 2012 г. и бустирующей ИГВ H5N1 в 2014 г. проводили на добровольцах в возрасте 18-51 лет в полном соответствии с национальным стандартом РФ (ГОСТ Р52379-2005) «Надлежащая клиническая практика». Вакцинацию и отбор биологических материалов осуществляли по схеме: до вакцинации (Д0), первая вакцинация (Д0), через 7 дней после первой вакцинации (Д7), через 28 дней после первой вакцинации (Д28), вторая вакцинация (Д28), отбор проб через 28 дней после второй вакцинации (Д56). Вакцины вводили

стандартным методом, то есть интраназально в случае ЖГВ и внутримышечно – в случае ИГВ.

3.3. Интенсивность репродукции вирусов в эксперименте на животных.

Интенсивность репродукции вирусов в верхних и нижних отделах дыхательного тракта оценивались на мышах линии СВА, инфицированных интраназально под легким эфирным наркозом стандартной дозой вируса $5,5 \text{ IgTCID}_{50}$ в 20 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера. Каждая группа мышей состояла не менее, чем из 5 особей. Инфекционный титр вируса гриппа определяли путем титрования на культуре клеток MDCK стандартным методом. Изъятие тканей верхнего отдела дыхательных путей и легких производили на 3 сутки после заражения. Наличие репродукции вируса в органах определяли путем титрования гомогенатов тканей в развивающихся куриных эмбрионах, после чего определяли 50% инфекционную дозу по методу Рида и Менча [134].

3.4. Штаммы

В иммунологических тестах использовали апатогенные вакцинные штаммы NIBRG–23 (H5N1), A/17/утка/Потсдам/86/92(H5N2), A/17/индюк/Турция/05/133(H5N2), A/17/mallard/Нидерланды/00/95(H7N3), A/Ленинград/134/17/57(H2N2) из музея отдела вирусологии НИИЭМ. Для заражения экспериментальных животных применяли 15 штаммов вируса гриппа A(H2N2), полученных ранее при помощи целенаправленного точечного мутагенеза. Данные штаммы содержали одиночные и комплексные мутации во внутренних генах, присущие донору аттенуации A/Ленинград/134/17/57(H2N2) [103]. В качестве контрольных вирусов использовали штамм с полным набором мутаций донора аттенуации во внутренних генах (Len/17 ca) и его «дикий» предшественник без мутаций (Len/134 wt). Характеристики вирусов представлены в таблице 4.4.1.

3.5. Эксперимент на мышах

Для воспроизведения экспериментальной гриппозной инфекции и вакцинации использовали линейных мышей СВА/J (самок) в возрасте 8 – 10 недель, полученных из питомника «Рапполово» РАМН. Животных содержали в условиях

вивария на стандартном рационе питания при свободном доступе к воде. Работа выполнялась в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. До начала исследований все животные находились на карантине в течение одного месяца.

Интенсивность репродукции вирусов в верхних и нижних отделах дыхательного тракта оценивалась на мышах линии СВА, инфицированных интраназально исследуемыми вирусами в дозе $5,5 \text{ IgTCID}_{50}$ в 20 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера, интраназально, под легким эфирным наркозом. Инфекционный титр исследуемых вирусов гриппа определяли путем их титрования на культуре клеток MDCK стандартным методом. Изъятие тканей верхнего отдела дыхательных путей и легких производили на 3 сутки после заражения. Наличие репродукции вируса в органах определяли путем титрования гомогенатов тканей в развивающихся куриных эмбрионах, после чего определяли 50% инфекционную дозу по методу Рида и Менча

3.6. Реакция торможения гемагглютинации

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) выполняли по общепринятой методике [2]. Рабочая доза каждого антигена составляла 4 гемагглютинирующие единицы (ГАЕ) в 50 мкл физиологического раствора. Для удаления термостабильных и термолабильных ингибиторов гемагглютинации исследуемые СК в разведении 1 : 10 обрабатывали экстрактом нейраминидазы авирулентного штамма холерного вибриона («DeKa Seiken», Япония). Затем прогревали при 56°C 30 мин. После этого готовили серию двукратных разведений сывороток (с 1:10 до 1:320) в объеме 50 мкл. К каждому разведению добавляли по 50 мкл рабочей дозы антигена. По окончании часового контакта сывороток с вирусом при комнатной температуре к смеси добавляли по 100 мкл 1% суспензии эритроцитов кур. Панели встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 40-45 мин, после чего учитывали результаты реакции. За титр сыворотки принимали наибольшее разведение, в котором отмечалось полное торможение гемагглютинации. Применяли 1% взвесь человеческих эритроцитов 0(I) группы крови. Достоверной

конверсией титров антител считали его поствакцинальное увеличение в 4 и более раза по отношению к довакцинальному.

3.7. Реакция микронеutralизации

Реакция микронеutralизации выполняли стандартным методом [160] на культуре клеток MDCK в концентрации 200 тыс. клеток/мл. Рабочее разведение вируса составляло 100 TCD₅₀/50 мкл. Достоверным считали увеличение титра сывороточных антител в 4 и более раза в поствакцинальный период по отношению к довакцинальному. РМН была проведена ведущим научным сотрудником лаборатории биотехнологии диагностических препаратов отдела биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, д.б.н. В.З. Кривицкой.

3.8. Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ проводили по разработанной ранее методике [13]. На полистироловые планшеты («Медполимер», Россия) сорбировали по 100 мкл очищенных ультрацентрифугированием в 30 – 60% градиенте плотности сахарозы антигенов вирусов гриппа в рабочей дозе 16 ГАЕ/0,1 мл. Иммунизацию осуществляли в течение 18 ч при 4 °С. Избыток антигена удаляли путем трехкратного промывания фосфатно-солевым буфером по 100 мкл. Далее в каждую лунку планшета вносили по 50 мкл фосфатно-солевого буфера, и добавляли в ряд А по 50 мкл исследуемых проб (смывов или сывороток), после чего титровали их с разведения 1:2 до 1:256, или с цельного образца до разведения 1:64, в случае образцов слюны. По окончании двухчасовой инкубации при комнатной температуре планшеты троекратно промывали фосфатно-солевым буфером. Затем в каждую лунку планшета вносили по 50 мкл конъюгата в рабочем разведении. При проведении анализа были использованы следующие конъюгаты: кроличьи антитела к IgA, IgG и IgM мыши, и поликонъюгат – кроличьи антитела к IgG+IgM+IgA мыши, меченные пероксидазой хрена («ICN Pharmaceutical», США). После часового контакта при комнатной температуре избыток конъюгата удаляли четырехкратным промыванием фосфатно-солевым буфером и в каждую лунку вносили по 50 мкл субстрат-хромогенной смеси – ортофенилендиамина (ОФД) («Sigma», США), растворенного в цитратно-фосфатном буфере (pH 3,5) с

добавлением H_2O_2 (0,035%). Планшеты помещали на 20 мин в защищенное от света место. Остановку реакции производили путем добавления в лунки 50 мкл 2N серной кислоты. Оптическую плотность (ОП) оценивали на спектрофотометре («Bio-Tec Instruments», Финляндия) при длине световой волны 490 нм. За титр антител принимали последнее разведение исследуемого материала, ОП которого превышавшее в 2 и более раза среднее арифметическое значение ОП лунок с контролем конъюгата (все ингредиенты реакции без исследуемого образца).

3.9. Определение в ИФА антител, секретируемых *in vitro* культурами МПК

Определение проводилось по модифицированной методике He X.S. с соавторами [98]. Из крови волонтеров выделяли МПК в градиенте плотности, с использованием раствора «Histopaque». Полученные клетки культивировали в течение 4 дней при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2 . По окончании инкубации, собирали надосадки, которые очищали центрифугированием в течение 10 минут при 1500 оборотах в минуту. Полученные образцы замораживали при температуре – 70°C до исследования.

Дальнейшее исследование проводилось методом иммуноферментного анализа по приведенной выше методике.

3.10. Определение индекса avidности секреторных IgA методом ИФА с мочевиной (ИФАм)

В полистироловых планшетах сорбировали очищенные ультрацентрифугированием вирусы по методике, описанной в пункте, посвященном иммуноферментному анализу.

В лунки вносили 50мкл разведенных к 1:8 в фосфатно-солевом буфере СВДП. Каждый образец был внесен в три отдельные лунки. Инкубировали образцы в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего промывали по схеме, описанной в пункте, посвященном иммуноферментному анализу. Для разобщения комплексов антиген-антитело вносили 50мкл 5М раствора мочевины в фосфатно-солевом буфере и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. В контрольные лунки вносили фосфатно-солевой буфер. Далее промывали лунки как описано выше и вносили 50мкл конъюгата в рабочем разведении в фосфатно-

солевом буфере. Инкубировали планшеты в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего их отмывали по схеме. Вносили 50мкл субстрат-хромогенной смеси – ортофенилендиамина (ОФД) («Sigma», США), растворенного в цитратно-фосфатном буфере (pH 3,5) с добавлением H₂O₂ (0,035%). Планшеты помещали на 20 мин в защищенное от света место. Остановку реакции производили путем добавления в лунки 50 мкл 2N серной кислоты. Оптическую плотность оценивали на спектрофотометре («Bio-Тес Instruments», Финляндия) при длине световой волны 490 нм. За титр антител принимали последнее разведение исследуемого материала, ОП которого превышавшее в 2 и более раза среднее арифметическое значение ОП лунок с контролем конъюгата (все ингредиенты реакции без исследуемого образца). Расчёт индекса avidности (ИА) проводили по формуле:

$$\text{ИА} = \frac{\text{средняя оптическая плотность в лунках обработанных мочевиной}}{\text{средняя оптическая плотность в контрольных лунках}} \times 100, \%$$

3.11. Определение вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток иммунологической памяти

Для определения количества CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов периферической крови людей использовали моноклональные антитела к CD4, меченные R-PE и моноклональные антитела к CD8, меченные PE-Cy5 («BD Biosciences Pharmingen», США). К 50 мкл цельной гепаринизированной венозной крови добавляли 50 мкл антител и инкубировали при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 30 мин. Затем к каждой пробе на 10 мин. добавляли по 1 мл раствора, лизирующего эритроциты («BD Biosciences Pharmingen», США). По истечении этого времени клетки отмывали раствором «cell wash» и ресуспендировали в 250 мкл этого раствора. Учет результатов проводили по данным проточной цитофлуориметрии на приборе «BD FACS-calibur», США.

Процент CD4⁺ Т-хелперов (Th), CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) и CD19⁺ В-лимфоцитов НАЛТ и селезенки мышей оценивали с помощью набора

меченных FITC моноклональных антител («BD Biosciences Pharmingen», США). К 100 мкл клеточной суспензии добавляли по 10 мкл антител и инкубировали в защищенном от света месте в течение 15 мин. при комнатной температуре. Избыток антител удаляли путем отмывания раствором «cell wash» («BD Biosciences Pharmingen», США), после чего клетки ресуспендировали в 500 мкл этого раствора. Учет результатов проводили по данным проточной цитофлуориметрии на приборе «BD FACS-calibur», США.

3.12. Статистическая обработка результатов

Использовали программное обеспечение Statistica, GraphPad Prism5 и «MS Excel» с применением непараметрических методов (U-критерия Манна-Уитни, теста Вилкоксона для парных сравнений и коэффициента корреляции по Спирмену). За уровень статистической значимости была принята $p < 0,05$. Средние величины уровней антител представлены в виде средних геометрических обратных значений титров (СГТ).

4. Собственные исследования

Глава 4.1. Формирование постинфекционного гетеросубтипического иммунитета у людей к птичьим (H5N1, H5N2) и человеческому (H2N2) вирусам гриппа А в условиях современного эпидемического процесса.

Состояние различных видов гетеросубтипического адаптивного иммунитета к не циркулирующим подтипам вируса гриппа А антропонозного и зоонозного происхождения тестировали по наличию кроссреактивных антител и Т-клеток.

В таблице 4.1.1 представлены данные об обнаружении в 2012-2013 гг. у лиц 18-45 лет сывороточных антигемагглютинирующих антител (РТГА), сывороточных вируснейтрализующих антител (РНН), сывороточных IgA-антител (ИФА) и локальных IgA-антител (ИФА) к потенциально пандемическому вирусу А(H5N1), к птичьим вирусам А(H5N2), выделенным от утки и индюка, а также, для сравнения, к вирусу А(H1N1)pdm2009 перед началом его пандемической циркуляции в 2009 году.

Таблица 4.1.1

Обнаружение у людей 18-45 лет сывороточных и локальных антител к различным подтипам вируса гриппа А

Вирусы гриппа А	Обратная величина средних геометрических титров антител*			
	РТГА (СК)	РНН (СК)	ИФА-IgA(СК)	ИФА-IgA (СВДП)
NIBRG-23 (H5N1)	2,5 ¹	5,5	27,6 ³	7,1 ⁵
А/утка/Потсдам/86/92 (H5N2)	3,4 ¹	5,3 ⁷	31,5 ³	9,7 ⁵
А/индюк/Турция/65/133 (H5N2)	2,6 ¹	5,3	25,4 ³	6,6 ^{5,8}
А/H1N1/pdm2009	7,1 ²	НИ**	99,6 ⁴	71,1 ⁶

* В каждой позиции обследовано от 48 до 110 человек; биологический материал отобран до вступления в циркуляцию вируса гриппа А/H1N1/pdm2009.

Цифры 1-8 означают наличие статистически значимых отличий между показателями: 1-2 $p < 0,05$; 3-4 $p < 0,01$ и $p > 0,001$; 5-6 $p < 0,001$; 7-8 $p < 0,01$ и $p > 0,001$

** Не исследовали.

СГТ всех типов антител к вирусам А(Н5N1) и А(Н5N2) существенно не отличались ($p > 0,05$). СГТ сывороточных и локальных антител к вирусу А(Н1N1)pdm 2009 в предпандемический период оказались намного выше СГТ тех же антител к птичьим вирусам. СГТ локальных антител превосходили аналогичные показатели сывороточных антигемагглютинирующих и частично вируснейтрализующих антител. Самые высокие СГТ антител к птичьим вирусам отмечены при выявлении сывороточных IgA-антител (1:25 – 1:32), затем, в порядке убывания, локальных IgA-антител (1:7 – 1:10), сывороточных вируснейтрализующих антител (1:5) и сывороточных антигемагглютинирующих антител (1:3).

Таблица 4.1.2 дает представление о повозрастном распределении уровней антител к вирусу гриппа птиц А/индюк/Турция/05/133(Н5N2) у 139 лиц от 18 до 84 лет. Данные приведены по двум показателям: СГТ антител и число (%) лиц со значимыми и защитными титрами антител.

Таблица 4.1.2

Обнаружение антител к птичьим вирусам гриппа А/индюк/Турция/05/133(Н5N2) у взрослых людей разного возраста

Годы рождения	Возраст (лет) / число лиц	Обратная величина средних геометрических титров антител и число (%) лиц с обозначенными титрами*											
		РТГА			PMH			ИФА-IgA в СВДП***			ИФА-IgA в слюне		
		СГТ	1:20	≥1:40**	СГТ	1:20	≥1:40	СГТ*	1:20	≥ 1:64**	СГТ	1:8	≥ 1:16**
1989-1995	18-24/26	2,5	0	0	5,2	0	0	3,0 ¹	0	0	3,6 ³	2(7,7%)	0
1979-1988	25-34/18	2,6	0	0	5,3	0	0	4,2 ¹	0	0	4,8 ³	2(11,1%)	2 (11%)
1969-1978	35-44/24	2,6	0	0	5,3	0	0	3,2 ¹	0	0	2,6 ³	2(8,4%)	1 (4%)
1947-1956	57-66/26	2,5	0	0	5,2	0	0	14,2 ²	0	4 (15%)	11,3 ⁴	2(7,7%)	13 (50%)
1937-1946	67-76/24	2,5	0	0	5,5	0	0	25,7 ²	0	8 (33%)	17,4 ⁴	2(8,3%)	17 (71%)
1927-1936	77-84/21	2,5	0	0	5,3	0	0	11,3 ²	0	4 (19%)	13,1 ⁴	2(9,5%)	12 (46%)

Цифры 1-4 означают наличие статистически значимых отличий между показателями: 1-2 $p < 0,05$ и $p < 0,01$; 3-4 $p < 0,05$ и $p < 0,01$

* Отбор материалов проводился в 2012 г.

** Защитные титры антител.

Сывороточные антигемагглютинирующие и вируснейтрализующие антитела к данному вирусу как в значимых, так и в защитных титрах во всех

возрастных группах отсутствовали, а СГТ антител не отличался и был крайне низким (1:3). В данных о СГТ локальных IgA-антител в СВДП и слюне наблюдалась тенденция к повозрастному увеличению показателей соответственно в пределах от 1:3 до 1:26 и от 1:3 до 1:17. У части лиц обнаруживались локальные антитела в СВДП в значимых (11-27%) и защитных (15-33%) титрах. То же самое наблюдалось и в отношении локальных антител в слюне, особенно по защитным титрам (50-70%). Обращает на себя внимание то, что количественные показатели обнаруженных локальных IgA-антител в СВДП и слюне были выше у лиц, родившихся до 1968 г (1927-1956 гг.), по сравнению с родившимися после 1968 г (1969-1995). Первые были праймированы вирусом H2N2 в 1957-1968 гг., а вторые не встречались с этим возбудителем из-за своего возраста.

Таким образом, данные таблиц 4.1.1 и 4.1.2 свидетельствуют, что сывороточные антигемагглютинирующие и вируснейтрализующие антитела к птичьим вирусам с гемагглютинином H5 у обследованных возрастных контингентов отсутствуют. Однако у них выявляются в СВДП и слюне кроссреактивные локальные IgA-антитела к этим вирусам и даже в защитных титрах.

В таблице 4.2.3 представлены данные об обнаружении в 2012-2013 гг. сывороточных и локальных антител к вирусу гриппа А (H2N2) у трех возрастных групп населения: родившихся после 1968 г, то есть у лиц, не встречавшихся с этим вирусом в 1957-1968 гг. (не праймированные лица), у родившихся непосредственно в период его циркуляции в 1957-1968 гг. и у родившихся до его распространения, то есть контактировавших не только с ним, но и с предшествующим подтипом А (H1N1). Последние две группы относились к ранее праймированным.

Сывороточные антигемагглютинирующие антитела к вирусу А(H2N2) выявлялись только у ранее праймированных людей в значимых и защитных титрах. При этом СГТ данных антител у родившихся до 1957 г. оказались в два раза выше, по сравнению с лицами, родившимися в период его циркуляции в 1957-1968 гг. Однако локальные IgA-антитела были обнаружены в достоверных

и защитных титрах не только у праймированных, но и у не праймированных лиц, то есть, у родившихся после 1968 г. Как и в случае с сывороточными антителами, наибольшее значение СГТ локальных антител отмечены у людей, родившихся в период пандемического распространения предыдущего подтипа А(Н1N1).

Таблица 4.1.3

**Обнаружение у лиц разного возраста антител к вирусу гриппа
А/Ленинград/134/17/57(Н2N2)**

Годы рождения	Обратные величины средних геометрических титров антител и число (%) лиц с обозначенными титрами											
	РТГА (СК)				ИФА-IgA (СВДП)				ИФА-IgA (слюна)			
	Число лиц	СГТ	Титры		Число лиц	СГТ	Титры		Число лиц	СГТ	Титры	
			≥ 1:20	≥ 1:40			≥ 1:32	≥ 1:64*			≥ 1:8	≥ 1:16*
После 1968	126	2,5 ¹	0	0	125	7,7 ³	18 (14,4%)	8 (6,4%)	93	3,3 ⁵	19 (20,4%)	10 (10,7%)
1957-1968	16	10,0 ¹	4 (25%)	3 (18,8%)	21	9,8 ³	4 (19,0%)	1 (4,8%)	13	3,6 ⁵	1 (7,7%)	3 (23,1%)
До 1957	57	20,7 ²	29 (50,9%)	10 (26%)	50	15,1 ⁴	12 (24%)	10 (20%)	58	8,3 ⁶	5 (8,6%)	28 (48,3%)

Отбор материалов проводился в 2012-2013 гг.

Цифры 1-6 означают наличие статистически значимых отличий между показателями: 1-2 $p < 0,05$ и $p < 0,01$; 3-4 $p < 0,05$ и $p < 0,01$; 5-6 $p < 0,05$.

* Защитные титры антител.

Таблица 4.1.4 содержит данные по выявлению антител к вирусу А(Н2N2) у другой группы лиц. В этом исследовании дополнительно включили РМН. Все лица родились после 1968 г, то есть не были праймированы вирусом А(Н2N2) в 1957-1968 гг. В РТГА, РМН и ИФА использовали другой штамм вируса гриппа А(Н2N2).

Сывороточные антитела у этих людей не определялись ни в РТГА, ни в РМН. В то же время, у 28% лиц обнаружены локальные IgA-антитела в значимых или защитных титрах.

Таблица 4.1.4

Обнаружение антител к вирусу A/17/Калифорния/66/359(H2N2) у лиц не праймированных вирусом гриппа А (H2N2) в 1957-1968 гг.

Годы рождения	Число лиц	Средний геометрический титр и число (%) лиц с обозначенными титрами								
		PMH (СК)			РТГА (СК)			ИФА-IgA (СВДП)		
		СГТ	1:20	≥1:40	СГТ	1:20	≥1:40	СГТ	1:32	≥1:64
1969-1996	36	1:5,4	0	0	1:2,5	0	0	7,2	7 (19,4%)	3 (8,3%)

* Отбор материалов проводился в 2014 г.

Таким образом, согласно данным таблиц 4.1.3 и 4.1.4, сывороточные антигемагглютинирующие (РТГА) и вируснейтрализующие (PMH) антитела к вирусу А(H2N2) не выявлялись у лиц, не праймированных данным возбудителем. Но у части этих определяли кроссреактивные локальные IgA-антитела. В этом случае концентрация этих антител оказалась значительно выше у лиц, родившихся до 1957 г., в сравнении с родившимися в 1957-1968 гг.

Таблица 4.1.5 дает представление об изменении у людей 18-50 лет локального иммунитета к вирусам А(H5N1), А(H5N2), А(H1N1)pdm 2009 и А(H3N2) после эпидемии гриппа А(H1N1), по сравнению с доэпидемическим периодом.

Таблица 4.1.5

Обнаружение антител у людей локальных IgA-антител к различным подтипам вируса гриппа А в до- и постэпидемический сезон 2012-2013 гг.

Вирус гриппа	Обратная величина средних геометрических титров антител*		
	Октябрь 2012	Апрель 2013	Кратность прироста
А (H5N1)**	7,4	14,1	1,9
А (H5N2)***	9,0	16,2	1,8
А (H1N1)pdm2009	12,9	69,7	5,4
А (H3N2)****	9,9	19,7	2,0

*Обследован 71 человек

** NIBRG-23 (H5N1)

*** А/индюк/Турция/05/133 (H5N2)

**** А/Брисбэн/10/2007 (H3N2)

СГТ локальных IgA-антител к возбудителю эпидемии вирусу А(H1N1) увеличились в 5,4 раза. В то же время отмечено увеличение этого показателя и к другим вирусам, хотя и с меньшей интенсивностью: к А(H5N1) в 1,9 раза ($p < 0,05$), к А(H5N2) в 1,8 раза ($p < 0,05$) и к А(H3N2) в 2,0 раза ($p < 0,05$). Эти данные

свидетельствуют, что эпидемия, вызванная вирусом гриппа А(Н1N1), индуцировала у людей выработку кроссреактивных локальный IgA антител к другим подтипам данного возбудителя, в том числе и к птичьим.

В 2011 году зарегистрирована локальная вспышка свиного гриппа А(Н3N2) среди людей [69]. В этой связи встал вопрос об иммунологической кроссреактивности человеческого и свиного вирусов подтипа А(Н3N2) [101].

Проведенный нами анализ обнаружил у людей разного возраста сывороточные антигемагглютинирующие антитела к данным вирусам (табл. 4.1.6)

Таблица 4.1.6

Обнаружение у людей разного возраста сывороточных антигемагглютинирующих антител к свиному и человеческому вирусам гриппа А (Н3N2).

Годы рождения	Возраст (лет)	Число лиц	Титры антител по данным РТГА*			
			Свиной-А/Индиана/10/2011 (swH3N2)		Человеческий-А/17/Перт/87 (H3N2)	
			СГТ	Титры \geq 1:40	СГТ	Титры \geq 1:40
1991-2000	11-20	30	13,8	8 (26,7%)	21,4 ³	10 (33,3%)
1981- 1990	21-30	30	33,2 ¹	16 (53,3%)	30,1 ³	9 (30,0%)
1951-1960	51-60	30	9,3 ²	3 (10%)	10,5 ⁴	4 (13,3%)
1941-1950	61-70	30	9,1 ²	1 (3,3%)	12,0 ⁴	5 (16,7%)
1926-1940	71-85	37	8,6 ²	3 (8,1%)	9,5 ⁴	2 (5,4%)

Цифры 1-4 означают наличие статистически значимых отличий между показателями: 1-2 $p < 0,01$; 3-4 $p < 0,01$

*Сыворотки крови отобраны в апреле-мае 2011 г.

Оказалось, что повозрастной профиль СГТ этих антител к человеческому и свиному вирусам А(Н3N2) был очень сходным и отражал поражаемость разных возрастных контингентов актуальным вирусом гриппа А(Н3N2) в эпидемический сезон. При этом у значительной части лиц активного возраста (до 53%) были выявлены антитела к свиному вирусу в защитных титрах, хотя данные люди и не встречались с ним.

Данные рисунка 4.1.1 отражают обнаружение у людей 18-45 лет, не праймированных вирусами А(Н2N2), А(Н5N1) и А(Н5N2), кроссреактивных Т-клеток иммунологической памяти к этим возбудителям. Полученные результаты свидетельствуют, во-первых, о наличии у части людей данных клеток, а во-вторых, о

значительных индивидуальных отличиях всех количественно-качественных показателей.

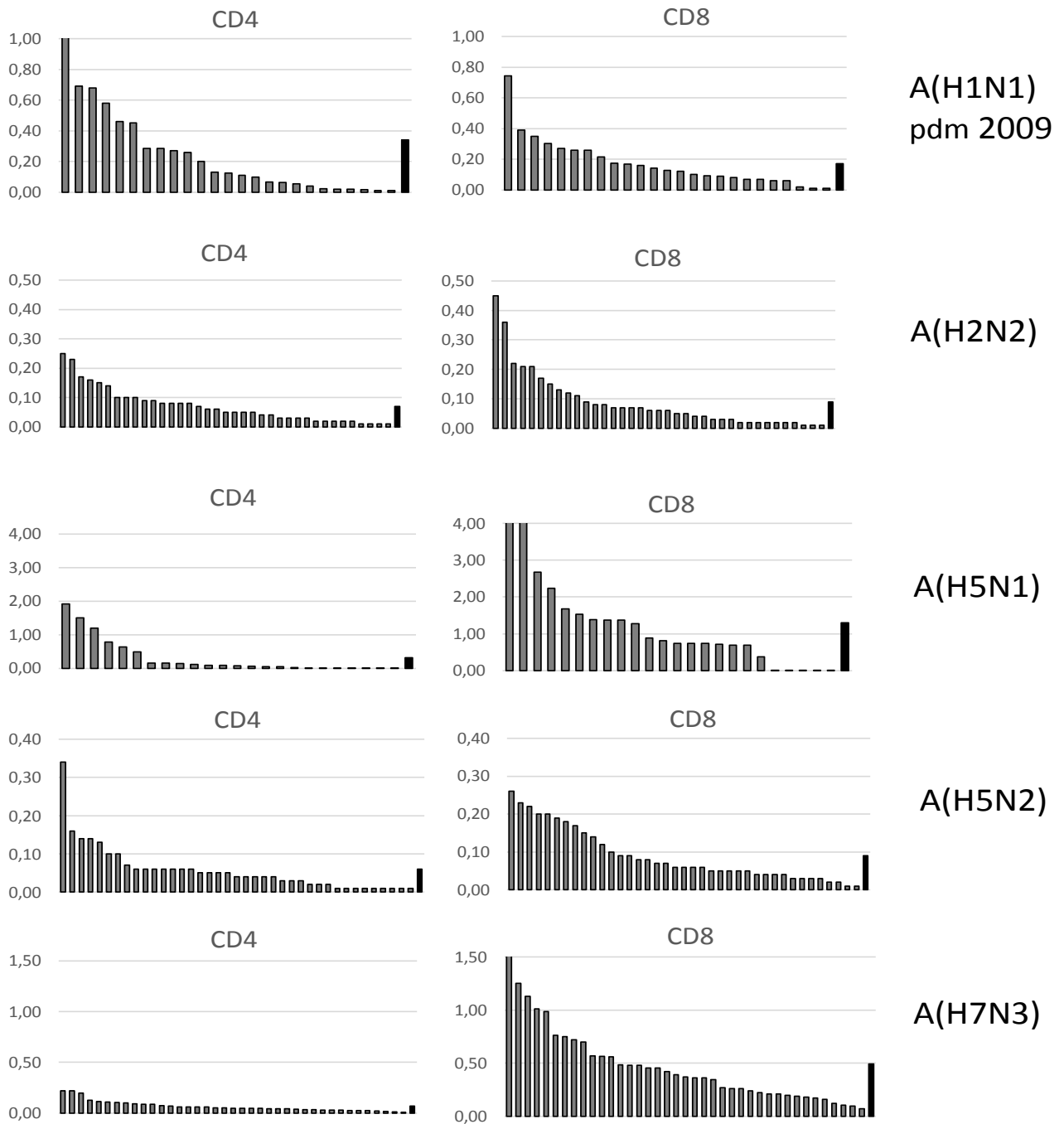


Рисунок 4.1.1. Обнаружение у взрослых людей 18-45 лет CD4+ и CD8+ Т-клеток к человеческим и птичьим вирусам гриппа А.

Резюме

Поскольку существует реальная угроза появления новых пандемических вирусов гриппа А зоонозного или антропонозного происхождения, проведено комплексное исследование состояния системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного гетеросубтипического иммунитета взрослых людей к потенциально пандемическим вирусам А(Н2N2), А(Н5N1), А(Н5N2), А(swН3N2). У части не праймированных лиц обнаружены кроссреактивные локальные IgА-антитела, а также кроссреактивные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки иммунологической памяти к вирусам А(Н5N1), А(Н5N2) и А(Н2N2). У этих людей не выявлялись сывороточные антигемагглютинирующие и вируснейтрализующие антитела. У лиц, праймированных вирусом А(Н2N2) в 1957-1968 гг., обнаружены высокие титры сывороточных антигемагглютинирующих и локальных IgА-антител к данному подтипу. Показано, что эпидемическая циркуляция вируса А(Н1N1) индуцировала выработку у населения кроссреактивных локальных IgА антител к птичьим вирусам А(Н5N1) и А(Н5N2). Установлена антигенная идентичность свиного и человеческого вирусов гриппа А (Н3N2) по индукции у людей кроссреактивных сывороточных антигемагглютинирующих антител к этому вирусу.

Глава 4.2. Гомологичный и гетерологичный иммунный ответ людей на ЖГВ H5N2

В предыдущей главе был изучен вопрос о формировании у людей постинфекционного гетеросубтипического иммунитета к птичьим вирусам гриппа А(H5N1) и А(H5N2) при инфицировании актуальными вирусами А(H1N1) и А(H3N2), то есть в условиях естественного эпидемиологического процесса.

В настоящей главе представлены материалы, отражающие иммунный ответ людей к птичьим вирусам гриппа А(H5N1), А(H5N2) и А(H7N3) при его искусственной стимуляции ЖГВ H5N2. Тестировали иммунные факторы представляющие разные звенья адаптивного противогриппозного иммунитета: сывороточные антигемагглютинирующие антитела (РТГА), сывороточные вируснейтрализующие антитела (РН), сывороточные IgA- и IgG-антитела(ИФА), локальные IgA-антитела в слюне и СВДП (ИФА), вирусспецифические CD4+ и CD8+ Т-клетки иммунологической памяти (ВОЦ).

Таблица 4.2.1

Частота гомологичных и гетерологичных гуморальных иммунных ответов волонтеров на прививку ЖГВ А/индюк/Турция/05/133(H5N2).

Антитела (АТ)	Лабораторные тесты	Число (%) конверсий АТ у привитых волонтеров (n=29)							
		А/индюк/Турция/05/133 (H5N2)		А/утка/Потсдам/86/92 (H5N2)		NIBRG – 23 (H5N1)		А/17/селезень/Нидерланды/00/95 (H7N3)	
		Д28	Д28+Д56	Д28	Д28+Д56	Д28	Д28+Д56	Д28	Д28+Д56
Сывороточные	РТГА	4 (13,8) ¹	11 (37,9) ²	3 (10,3) ³	14 (48,3) ⁴	0	10	0	0
	РН	3(10) ⁵	14 (48,3) ⁶	НИ*	НИ	3 (10,3)	8 (27,6)	НИ	НИ
	ИФА-IgA	0	2 (6,9)	1 (3,4)	2 (6,9)	1 (3,4)	2 (6,9)	2 (6,9)	3 (10,3)
	ИФА-IgG	0	1 (3,4)	0	1 (3,4)	НИ	НИ	0	0
Локальные	ИФА-IgA (СВДП)	2 (6,9)	6 (20,7)	2 (6,9) ⁶	10 (34,5) ⁶	4 (13,8)	8 (27,6)	1 (3,4)	5(17,2)
	ИФА-IgG (слюна)	3 (10,3) ⁷	10 (34,5) ⁸	3 (10,3) ⁹	9 (31) ¹⁰	2 (6,9)	5 (17,2)	0	0
Всего по совокупным данным всех тестов		8 (27,6) ¹¹	23 (79,3) ^{12,17}	7 (24,1) ¹³	21 (72,4) ^{14,18}	5 (17,2) ¹⁵	19 (65,1) ¹⁶	3 (10,3)	7 (24,1) ¹⁹

Цифры 1-19 означают наличие статистически значимых отличий между показателями: 1-2, 3-4, 5-6, 7-8. 9-10 p<0,05; 11-12, 13-14, 15-16, 17-18, 18-19, 16-19 p<0,01.

* НИ – не исследовали

Таблица 4.2.1 содержит данные о % конверсий различных типов антител у 29 волонтеров после первой (Д28) и после первой и/или второй (Д28+Д56) прививки ЖГВ Н5N2. Изучали гомологичный ответ к вакцинному штамму и гетерологичный ответ к другому штамму вируса А(Н5N2), а также к потенциально пандемическим вирусам А(Н5N1) и А(Н7N3).

После двукратной вакцинации конверсии сывороточных антител в РТГА и/или РМН наблюдали только к вирусам со сходным гемагглютинином Н5, то есть к А(Н5N2) – индюк, А(Н5N2) – утка и А(Н5N1) (10-48%). Конверсии этих антител к вирусу А(Н7N3) отсутствовали. У части лиц фиксировали поствакцинальные конверсии сывороточных и/или локальных IgА антител не только к вакцинному штамму, и к штамму А(Н5N2) – утка (3-48%), но и к гетерологичным вирусам: А(Н5N1) и к А(Н7N3).

По суммарным данным, учитывающим конверсии антител во всех лабораторных тестах, то есть наличие тех или иных иммунных реакций на прививку, гуморальный иммунный ответ к вакцинному штамму зафиксирован после первой прививки у 28% волонтеров, а после второй – у 76% волонтеров. В случае гетерологичных штаммов А(Н5N2) – утка, А(Н5N1) и А(Н7N3), эти показатели составили, соответственно 17 и 66%, 17 и 59%, 10 и 24%. У волонтеров, получавших препарат плацебо (N=10) конверсии антител во всех тестах отсутствовали.

Таким образом, на двукратную вакцинацию ЖГВ Н5N2, абсолютное большинство волонтеров ответили конверсиями сывороточных и/или локальных антител к вакцинному штамму (79%). При этом, у значительной части волонтеров наблюдалась продукция тех же антител к гетерологичным вирусам со сходным с вакцинным штаммом гемагглютинином Н5 (65-72%). В случае, когда вакцинный и гетерологичный вирусы полностью отличались антигенной формулой (Н7N3), число конверсий антител

оказалось гораздо ниже (24%). Последние были выявлены только в ИФА, но не в РТГА и РМН.

Если в отношении частоты (%) гуморальных иммунных ответов у волонтеров на ЖГВ H5N2 результаты были вполне удовлетворительными, то данные об интенсивности продукции всех типов изученных антител оказались более скромными (таблица 4.2.2). Так после двукратной прививки СТГ сывороточных и локальных антител хотя и увеличился в 1,6-2,4 раза, но их уровень остался весьма низким: от 1:5 до 1:13 к вакцинному штамму, и от 1:4 до 1:15 к гетерологичным вирусам.

Таблица 4.2.2

Интенсивность гомологичных и гетерологичных гуморальных иммунных ответов у волонтеров после прививки ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2).

Лабораторный тест	Препарат (вакцина n=29, плацебо n=10)	Обратные величины средних геометрических титров антител											
		А/индюк/Турция/05/133 (H5N2)			А/утка/Потсдам/86/92 (H5N2)			NIBRG – 23 (H5N1)			А/17/селезень/Нидерланды/00/95 (H7N3)		
		Д0	Д56	Д56/Д0	Д0	Д56	Д56/Д0	Д0	Д56	Д56/Д0	Д0	Д56	Д56/Д0
РТГА	Вакцина	3	5 ¹	1,7	3	5 ¹	1,7	3	4	1,3	3	3	1,0
	Плацебо	3	3	1,0	32	2	1,0	2	2	1,0	3	3	1,0
РМН	Вакцина	5	12 ¹	2,4	НИ*	НИ	НИ	13 ¹	13 ¹	1,9	НИ	НИ	НИ
	Плацебо	5	5	1,0	НИ	НИ	НИ	7	7	1,0	НИ	НИ	НИ
ИФА-IgA (СВДП)	Вакцина	8	13 ¹	1,6	6	10 ¹	1,7	15 ¹	15 ¹	1,9	6	9 ¹	1,5
	Плацебо	4	4	1,0	5	5	1,0	8	8	1,0	6	6	1,0
ИФА-IgA (слюна)	вакцина	5	9 ¹	1,8	5	10 ¹	2,0	5	8 ¹	1,6	4	7	1,8
	Плацебо	6	6	1,0	5	5	1,0	5	4	0,8	4	4	1,0

Цифра 1 означает, СГТ антител после 2-й прививки (Д56) статистически значимо выше СГТ антител до вакцинации (Д0) при $p < 0,05$ или $p < 0,01$.

* Не исследовали.

Данные таблицы 4.2.3 отражают интенсивность иммунных ответов у привитых волонтеров с зафиксированным 4-х кратным и более приростом титров сывороточных и локальных антител. Приведены величины СГТ до прививки (Д0), после первой прививки (Д28) и после второй прививки (Д56) к тем же вирусам. Кратность увеличения СГТ после первой и второй вакцинации была не высокой и колебалась соответственно от 1,4 до 2,1 и от 4,0 до 7,0. Естественно, поствакцинальные титры всех типов антител у этих

лиц были выше, чем средние значения по всей группе привитых (таблица 4.2.2).

Таблица 4.2.3

Интенсивность гомологичных и гетерологичных гуморальных иммунных ответов на прививку ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2) у волонтеров с наличием поствакцинальных конверсий антител.

Лабораторные тесты и антитела (АТ)	Вирус гриппа А	Число лиц с конверсиями антител на прививку	Обратные величины средних геометрических титров (СГТ) АТ			Кратность увеличения СГТ	
			Д0	Д28	Д56	Д28/Д0	Д56/Д0
РТГА – сывороточные АТ	H5N2-индюк*	11	2,5	5,0 ¹	10,7 ¹	2,0	4,3
	H5N2-утка*	14	2,6	5,5 ¹	11,0 ¹	2,1	4,2
	H5N1*	3	2,5	5,0 ¹	10,0 ¹	2,0	4,0
ИФА сывороточные - IgA – АТ	H5N2-индюк	2	22,6	45,3 ¹	90,5 ¹	2,0	4,0
	H5N2-утка	1	32,0	64,0 ¹	128,0 ¹	2,0	4,0
	H7N3*	3	6,3	20,2 ¹	25,4 ¹	3,2	4,0
ИФА- локальные IgA – АТ (СВДП)	H5N2-индюк	6	5,0	9,0	28,5 ¹	1,8	5,7
	H5N2-утка	7	5,9	10,8 ¹	32 ¹	1,8	5,4
	H7N3	1	2,0	2,0	8,0 ¹	1,0	4,0
ИФА- локальные IgA – АТ (слюна)	H5N2-индюк	10	2,8	5,3 ¹	19,7 ¹	1,9	7,0
	H5N2-утка	4	2,8	4,0	19,0	1,4	6,8

* - Полное обозначение штаммов как в таблицах 4.2.1 и 4.2.2

Цифра 1 означает, что СГТ антител после 1-й и 2-й прививок (Д28, Д56) статистически значимо выше СГТ антител до вакцинации (Д0) при $p < 0,05$ или $p < 0,01$

В таблице 4.2.4 приведены сведения о конечных результатах вакцинации волонтеров ЖГВH5N2 с позиции традиционного представления об иммунологической протективности гриппозных вакцин – по числу (%) лиц с защитными титрами антигемагглютинирующих сывороточных антител (РТГА) $\geq 1:40$. Как видно по данным РТГА, такие люди отсутствовали даже после повторной вакцинации. У отдельных лиц обнаруживались поствакцинальные защитные титры локальных антител в СВДП (3-14%). Однако в отношении защитных титров локальных антител в слюне показатели

оказались значительно выше (28-31% после первой прививки и 48-55% после второй).

Таблица 4.2.4.

Число лиц с защитными титрами сывороточных и локальных антител после прививки ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2).

Лабораторные тесты и антитела (АТ)	Вирус гриппа А	Число (%) лиц с защитными титрами среди привитых ЖГВ*	
		Через 28 дней после 1-й прививки	Через 28 дней после 2-й прививки
РТГА-сывороточные	H5N2-индюк**	0	0
	H5N2-утка**	0	0
	H5N1**	0	0
	H7N3**	0	0
ИФА-локальные IgA- АТ (СВДП)	H5N2-индюк**	1 (3,4%)	2 (6,9%)
	H5N2-утка**	1 (3,4%)	4 (13,8%)
	H7N3**	0	0
ИФА-локальные IgA – АТ (слюна)	H5N2-индюк**	8 (27,6%)	15 (51,7%)
	H5N2-утка**	8 (27,6%)	14 (48,3%)
	H7N3**	9 (31,0%)	16 (55,2%)

* - РТГА $\geq 1:40$; ИФА- IgA – (СВДП) $\geq 1:64$; ИФА- IgA – (слюна) $\geq 1:16$

** - Полное обозначение штаммов как в таблицах 4.2.1 и 4.2.2

Далее был проанализирован вопрос о степени синхронности (согласованности) поствакцинальных гуморальных иммунных ответов на ЖГВ H5N2, фиксируемых у волонтеров в различных иммунологических тестах – таблица 4.2.5. Сравнивали показатели совпадения и расхождения числа (%) конверсий сывороточных (РТГА) и локальных (ИФА) антител, обнаруживаемых в пяти парах тестов после двукратной прививки ЖГВ H5N2: РТГА-РМН, РТГА-ИФА IgA (СВДП), РТГА-ИФА IgA (слюна), ИФА IgA (СВДП)-ИФА IgA(слюна), РТГА-ИФА IgA (СВДП+слюна).

Данные о фиксации приростов титров сывороточных антител в РТГА и локальных антител в ИФА расходились в 44-52% случаев. При этом только в РТГА отмечено 21-35% конверсий, только в ИФА – от 17 до 31%. Таким образом, пара РТГА - ИФА локальные IgA-антитела давала значительный уровень дополнительной информации по отношению друг к другу в оценке иммуногенности ЖГВ H5N2. Наименьшее расхождение отмечено между констатацией конверсий локальных антител в СВДП и слюне – 21%.

Сопоставление результатов обнаружения у привитых ЖГВ H5N2 волонтеров гуморальных иммунных ответов к вакцинному вирусу А/индюк/Турция/05/133 (H5N2) в различных лабораторных тестах.

Сравниваемые лабораторные тесты	Данные о наличии и отсутствии поствакцинальных конверсий антител после двукратной вакцинации волонтеров (N=29)			
	Совпадение результатов	Расхождение результатов	В том числе расхождение результатов	
			Положительные в первых тестах и отрицательные – во вторых	Отрицательные в первых тестах и положительные – во вторых
РТГА – РМН	14 (48,3%)	15 (51,7%)	6 (20,7%)	9 (31,0%)
РТГА – ИФА(IgA СВДП)	14 (48,3%)	15 (51,7%)	10 (14,5)	5 (17,2%)
РТГА – ИФА(IgA слюна)	16 (55,2%)	13 (44,8%)	7 (24,1%)	6 (20,7%)
ИФА(IgA СВДП) – ИФА(IgA СВДП)	23 (79,3%)	6 (20,7%)	1 (3,4%)	5 (17,2%)
РТГА – ИФА(IgA СВДП+слюна)	15 (51,7%)	14 (48,3%)	7 (24,1%)	7 (24,1%)

Таким образом, как гомологичный, так и гетерологичный (штаммы с гемагглютинином H5) гуморальный иммунный ответ людей на двукратную прививку ЖГВ H5N2 был хорошо выражен по кумулятивной частоте конверсий изученных пулов антител, но значительно слабее по интенсивности их продукции. Вакцинация не приводила к индукции сывороточных антигемагглютинирующих антител к вирусам А(H5N1) и А(H5N2) в защитных титрах. К гетерологичному вирусу А(H7N3) такие антитела не синтезировались вообще. Однако иммунизация сопровождалась накоплением кроссреактивных локальных IgA-антител, особенно в слюне. Совокупное использование РТГА и ИФА, значительно расширило представление об иммуногенности вакцин в отношении числа гуморальных иммунных реакций на прививку. Повторная вакцинация увеличивала этот показатель.

Таблица 4.2.6 содержит материалы, отражающие частоту (%) конверсий вирусспецифических CD4+ и CD8+ Т-клеток иммунологической памяти к вакцинному штамму у тех же привитых волонтеров, в том числе Т-клеток центральной (T_{cm}) и эффекторной (T_{em}) памяти. Анализировали конверсии этих клеток после двукратной вакцинации ЖГВ H5N2.

Т-клеточный иммунный ответ у волонтеров, привитых ЖГВ H5N2.

Субпопуляция Т-клеток		Число (%) лиц с достоверной* конверсией вирусспецифических Т-клеток после иммунизации		
		После 1-й прививки (Д28)	После 2-й прививки (Д56)	После 1-й и/или 2-й прививки
CD4+ IFN+	CD4	3 (10,3%)	5 (17,2%)	6 (20,7%)
	CD4 Tcm	5 (17,2%)	6 (20,7%)	8 (27,7%)
	CD4 Tem	5 (17,2%)	6 (20,7%)	11 (37,9%)
	CD4 Tcm и/или CD4 Tem	8 (27,7%)	16 (55,2%)	16 (55,2%)
CD8+ IFN+	CD8	1 (3,4%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)
	CD8 Tcm	2 (6,9%)	1 (3,4%)	3 (10,3%)
	CD8 Tem	6 (20,7%)	3 (10,3%)	8 (27,7%)
	CD8 Tcm и/или CD8 Tem	8 (27,7%)	10 (34,5%)	10 (34,5%)
Кумулятивные данные по всем клеткам		11 (37,9%)	18 (62,1%)	20 (69,0%)

* Достоверной конверсией считали 3 стандартных отклонения от показателей контрольной группы волонтеров, получивших препарат плацебо (N=10)

После первой прививки число конверсий CD4+ Т-клеток изученных фенотипов колебалось от 10 до 27%, после второй – от 17 до 55%, после первой и/или второй – от 21 до 55%. Для CD8+ Т-клеток эти показатели составляли соответственно 3-28%, 7-34% и 7-35%. В целом отмечена более частая индукция CD4+ Т-клеток иммунологической памяти по сравнению с аналогичными CD8+ Т-клетками. Кумулятивные данные, отражающие совокупное число поствакцинальных конверсий Т-клеток всех изученных фенотипов, составили 38% после первой прививки, 62% после второй прививки и 69% после первой и/или второй прививки.

Итоговые результаты по исследованию иммуногенности ЖГВ H5N2 представлены в таблице 4.2.7. Они отражают индивидуальные данные о наличии тех или иных изученных типов адаптивных иммунных реакций волонтеров на первую и/или вторую прививку. Эти результаты свидетельствуют, что 23 волонтера из 29 (79%) ответили конверсией различных типов антител, а 20 из 29 (69%) конверсиями разных фенотипов вирусспецифических Т-клеток иммунологической памяти к вакцинному штамму. Наличие гуморальных и/или Т-клеточных иммунных реакций отмечено у 28 из 29 (97%) привитых лиц.

Таблица 4.2.7

Итоговые индивидуальные данные о наличии достоверного гуморального и клеточного иммунного ответа у волонтеров, привитых живой гриппозной вакциной А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2).

№ п/п	Лаб. №	Наличие гуморального ответа (конверсии антител)							Наличие клеточного ответа ($\geq 3SD$ от среднего по плацебо) после первой и/или второй вакцинации							Всего по данным всех тестов
		РТГА	PMH	Сывор. IgG ИФА	Сывор. IgA ИФА	СВДП. IgA ИФА	Слюна. IgA ИФА	Всего	CD4+	CD8+	CD4 Tcm	CD4 Tem	CD8 Tcm	CD8 Tem	Всего	
1	2		+				+	+			+				+	+
2	3		+	+				+								+
3	4								+						+	+
4	5	+	+				+	+								+
5	6	+						+								+
6	9	+						+								+
7	10	+						+				+			+	+
8	11		+					+			+	+			+	+
9	13	+	+					+								+
10	15		+			+	+	+	+		+	+		+	+	+
11	16	+	+					+				+			+	+
12	18		+		+	+	+	+						+	+	+
13	26		+					+								+
14	27										+				+	+
15	30								+		+				+	+
16	31		+			+	+	+								+
17	32		+					+		+	+		+	+	+	+
18	33													+	+	+
19	34															
20	36											+		+	+	+
21	37	+	+					+	+		+		+		+	+
22	38	+					+	+				+		+	+	+
23	39	+				+	+	+				+		+	+	+
24	41	+					+	+				+			+	+
25	48	+	+					+		+	+				+	+
26	50					+	+	+	+			+		+	+	+
27	51				+	+		+	+		+	+			+	+
28	52		+					+					+		+	+
29	54						+	+								+
Итого		11	14	1	2	6	10	23	6	2	8	11	3	8	20	28

(+) – зафиксирован иммунный ответ

Таким образом, практически все волонтеры (97%), за исключением одного, ответили на прививку ЖГВ H5N2 В-клеточными (антитела) и/или Т-клеточными (вирусспецифические Т-лимфоциты памяти) иммунными реакциями. Обращает на себя внимание существенно более низкий показатель иммуногенности этой вакцины по данным единственного официально регламентированного теста – РТГА (38% конверсий антител).

В таблицах 4.2.8 – 4.2.10 приведены данные по изучению иммуногенности аналогичной ЖГВH5N2, произведенной в Таиланде из того же штамма А/индюк/Турция/05/133(H5N2) и испытанной там же в 2014 г. на взрослых лицах 19-26 лет. Иммунологические исследования проведены в 2015 г. совместно представителями Таиланда в лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИЭМ. Отчет отправлен в ВОЗ. По рекомендации ВОЗ, РТГА воспроизводили двумя дозами антигена: 2АЕ и 4АЕ. РМН ставили по той же методике, что и в прошлых исследованиях. Полученные данные были очень близки к результатам изучения в РТГА и РМН гуморального иммунного ответа на отечественную ЖГВ H5N2 (табл. 4.2.1 – 4.2.3), а именно: (i) значительное увеличение числа конверсий антител после второй прививки – таблица 4.2.8; (ii) одинаковое количество поствакцинальных конверсий антител по данным РТГА и РМН – соответственно 32 и 35% (Табл. 4.2.8); (iii) почти полное отсутствие у волонтеров в поствакцинальный период защитных титров антител (РТГА) $\geq 1:40$; (iv) очень низкие значения СГТ обоих типов антител во всех временных интервалах, то есть слабый по интенсивности гуморальный иммунный ответ на ЖГВ H5N2 (Табл. 4.2.9). Несколько выше он был у лиц с зафиксированными конверсиями антител (Табл. 4.2.10).

Таблица 4.2.8

Частота гуморальных иммунных ответов волонтеров на ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2) произведенной и испытанной в Таиланде.

Число привитых	Лабораторный тест		Число конверсий антител (АТ) к вакцинному вирусу			
			Д28***	Д49***	Д60***	Суммарно Д28+Д49+Д60
100*	РТГА	4 АЕ**	4 (4%) ¹	18 (18%)	25 (25%) ¹	25 (25%)
		2 АЕ**	4 (4%) ²	25 (25%)	29 (29%) ²	29 (29%)
		4АЕ+2АЕ	4 (4%) ³	25 (25%)	32 (32%) ³	32 (32%)
	РМН		8 (8%) ⁴	25 (25%)	29 (29%) ⁴	35 (35%)
	Суммарно РТГА (4АЕ+2АЕ)+РМН		11 (11%)	39 (39%)	44 (44%)	47 (47%)

* В контрольной группе волонтеров (N=49) конверсии АТ отсутствовали

** Доза антигена в агглютинирующих единицах (АЕ)

*** Д28 – через 28 дней после первой прививки, Д49 – через 21 день после 2-й прививки, Д60 – через 32 дня после 2-й прививки

Цифры 1-4 означают наличие статистически значимых отличий при p<0,05

Таблица 4.2.9

Интенсивность гуморальных иммунных ответов волонтеров на ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2), произведенной и испытанной в Таиланде.

Лабораторный тест		Препарат	Средний геометрический титр (СГТ) антител к вакцинному вирусу				Кратность изменения СГТ		
			Д0**	Д28**	Д49**	Д60	Д28/Д0	Д49/Д0	Д60/Д0
РТГА	4 АЕ*	Вакцина (N=100)	2,5 ¹	2,7	3,9	4,2 ¹	1,1	1,6	1,7
		Плацебо (N=49)	2,5	2,5	2,5	1,0	1,0	1,0	1,0
	2 АЕ*	Вакцина (N=100)	2,6 ²	2,8	4,3	4,5 ²	1,1	1,7	1,7
		Плацебо (N=49)	2,5	2,5	2,5	2,5	1,0	1,0	1,0
РМН		Вакцина (N=100)	5,1 ³	6,1	8,5	8,9 ³	1,2	1,7	1,7
		Плацебо (N=49)	5,0	5,1	5,1	5,1	1,0	1,0	1,0

* Как в таблице 4.2.8

** Д28 – через 28 дней после первой прививки, Д49 – через 21 день после 2-й прививки, Д60 – через 32 дня после 2-й прививки. В поствакцинальный период только у одного человека из 100 зафиксированы в РТГА защитный титр антител 1:80.

Цифры 1-3 означают наличие статистически значимых отличий при p<0,05

Таблица 4.2.10

Интенсивность гуморальных иммунных ответов на ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2) у волонтеров с наличием поствакцинальных конверсий антител (вакцина произведена и испытана в Таиланде).

Лабораторный тест	Число лиц с конверсиями антител	Средний геометрический титр (СГТ) антител к вакцинному вирусу				Кратность изменения СГТ		
		Д0**	Д28**	Д49**	Д60	Д28/Д0	Д49/Д0	Д60/Д0
РТГА 4 АЕ*	26	2,5	3,2	9,5	12,7	1,3	3,8	5,1
РТГА 2 АЕ*	29	2,6	3,7	12,4	14,7	1,4	4,7	5,6
PMH	35	5,2	8,2	19,6	22,5	1,6	3,8	4,3

* Как в таблице 4.2.8

** Как в таблице 4.2.9

Таким образом, проведенные исследования показали очень высокую схожесть между данными испытаний в России отечественной ЖГВ H5N2 и результатами исследований аналогичной вакцины, произведенной и испытанной в Таиланде.

Резюме

Проведено изучение особенностей формирования искусственно индуцированного гуморального и Т-клеточного иммунного ответа взрослых людей при первичном контакте с птичьим вирусом гриппа А(H5N2). Для этого использовали отечественную ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2). Тестировали сывороточные антитела (РТГА, РМН, ИФА), локальные антитела класса А (ИФА), а также вирусспецифические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки (в том числе Т_{ст} и Т_{ем}) иммунологической памяти. Гуморальный иммунный ответ изучали к гомологичному вакцинному штамму H5N2 и гетерологичным штаммам H5N2-утка, H5N1 и H7N3. По совокупным данным двукратная прививка ЖГВ H5N2 индуцировала у 97% волонтеров гомологичный иммунный ответ к вакцинному вирусу в виде конверсий тех или иных изученных типов антител и Т-клеток. Эта же вакцина стимулировала у 65-72% волонтеров гетерологичный гуморальный иммунный ответ, отражавшийся в конверсиях кроссреактивных сывороточных и/или локальных IgA – антител к вирусам с гемагглютинином H5 (H5N2-утка, H5N1). У 24% волонтеров отмечены конверсии кроссреактивных локальных IgA-антител к вирусу гриппа А (H7N3). Конверсии сывороточных антител (РТГА, РМН)

к данному вирусу полностью отсутствовали. Это свидетельствует, что выраженность гетерологичного гуморального иммунного ответа на ЖГВ H5N2 зависела от антигенной формулы вакцинного и гетерологичного вируса, то есть наличия или отсутствия в них общего гемагглютинина. Интенсивность как гомологичного, так и гетерологичных поствакцинальных гуморальных иммунных ответов, особенно сывороточных антител, оказалась низкой. Использование дополнительно к РТГА других иммунологических тестов (РМН, ИФА, определение вирусспецифических Т-клеток памяти) повышала показатели частоты конверсий факторов адаптивного иммунитета с 38 до 97%. Повторная прививка ЖГВ H5N2 увеличивала число антительных и Т-клеточных иммунных реакций. Проведенное исследование иммуногенности аналогичной тайландской ЖГВ H5N2, испытанной на волонтерах в той же стране, подтвердило данные, полученные при оценке иммуногенности отечественной ЖГВ H5N2.

Глава 4.3. Индукция у людей ЖГВ H5N2 гомологичной (H5N2) и гетерологичной (H5N1) долговременной иммунологической памяти

В предыдущей главе были представлены материалы, касающиеся изучения особенностей формирования у людей иммунного ответа на ЖГВ, приготовленную из птичьего вируса гриппа А (H5N2). Было показано, что этот препарат имеет вполне удовлетворительные показатели по частоте индуцируемых гуморальных иммунных ответов к вирусам А(H5N1) и А(H5N2), но весьма слабые по интенсивности антителообразования. В результате, в поствакцинальный период у волонтеров отсутствовали защитные титры антител к этим вирусам по данным регламентированного теста для оценки иммуногенности гриппозных вакцин – РТГА. Это затрудняло получение ответа на главный вопрос о гипотетической протективности данной вакцины. При отсутствии реальных событий по пандемическому «прорыву» птичьего вируса гриппа А(H5N1) в человеческую популяцию, гипотетическую протективность ЖГВ H5N2 можно проверить единственным способом – оценить ее способность индуцировать долговременную иммунологическую память к вирусу H5N1 в системе «праймирование-бустирование». Она подразумевает вакцинацию (праймирование) людей ЖГВ H5N2 с последующей отдаленной во времени прививкой (бустированием) вакциной А(H5N1). Если по критериям сохранения иммунологической памяти после бустирования будет развиваться усиленный и ускоренный иммунный ответ, то это позволит с очень высокой долей вероятности дать высокую оценку протективности ЖГВ H5N2 против вируса А(H5N1).

В рамках данного раздела работы исследован вопрос об иммунологических последствиях для взрослых людей праймирования отечественной ЖГВ H5N2 с последующим (через 1,5 года) их бустированием отечественной ИГВ H5N1. Контрольной группой волонтеров служили не праймированные лица, вакцинированные только ИГВ H5N1. Иммунный ответ на ИГВ H5N1 оценивали по индукции: сывороточных антител (РТГА, РМН, ИФА), антител, секретируемых in

in vitro в культурах МПК – РРАб (ИФА), avidности антител, а также вирусспецифических Т-клеток иммунологической памяти фенотипов CD4+ и CD8+.

Таблица 4.3.1 содержит данные об интенсивности продукции сывороточных антител к вирусам А(Н5N2) и А(Н5N1) в следующих группах: (1) у лиц, праймированных в 2012 г. ЖГВ Н5N2; (2) у тех же лиц после бустирования ИГВ Н5N1 в 2014 г; (3) у контрольной группы волонтеров, привитых только ИГВ Н5N1 в 2014 г.

Таблица 4.3.1

Интенсивность продукции антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих сывороточных антител после иммунизации волонтеров праймирующей ЖГВ Н5N2 и бустирющей ИГВ Н5N1.

Лабораторный тест	Вирус гриппа	Обратные величины средних геометрических титров (СТГ) антител															
		Праймированные ЖГВ Н5N2 в 2012 г. (N=19)				Бустированные ИГВ Н5N1 те же лица в 2014 г. (N=19)						Привитые только ИГВ Н5N1 в 2014 г. - контрольная группа волонтеров (N=24)					
		Д0	Д28	Д56	Д56/Д0	Д0	Д7	Д28	Д56	Д7/Д0	Д56/Д0	Д0	Д7	Д28	Д56	Д7/Д0	Д56/Д0
РТГА	Н5N2*	3	4	5	2,5	3	6 ¹	43 ²	62 ³	2,0	20,7	3	3 ¹	6 ²	8 ³	1,0	2,5
	Н5N1*	3	3	3	1,0	3	8 ⁴	32 ⁵	45 ⁶	2,5	15,0	3	3 ⁴	6 ⁵	9 ⁶	1,0	3,0
PMH	Н5N2	5	6	11	2,0	14 ⁷	138 ⁸	398 ⁹	398 ¹⁰	9,2	26,5	6 ⁷	25 ⁸	57 ⁹	147 ¹⁰	4,2	24,5
	Н5N1	НИ**	НИ	НИ	НИ	8	67 ¹¹	166 ¹²	239 ¹³	8,4	30,0	6	16 ¹¹	32 ¹²	73 ¹³	2,5	12,2

Цифры 1-13 означают достоверные отличия СТГ антител в опытной и контрольной группах 1 – p<0,05; 2 – p<0,01; 3 – p<0,001; 4 – p<0,05; 5 – p<0,01; 6 – p<0,05; 7 – p<0,05; 8 – p<0,01; 9 – p<0,01; 10 – p<0,01; 11 – p<0,001; 12 – p<0,01; 13 – p<0,01;

* Н5N2 – А/индюк/Турция/05/133 (Н5N2); Н5N1 – NIBRG-23

Д0 – до прививки; Д7 – через 7 дней после 1-й прививки; Д28 – через 28 дней после 1-й прививки; Д56 – через 28 дней после 2-й прививки; Д7/Д0 и Д56/Д0 – кратность изменения СТГ антител.

** Не исследовали

У лиц, праймированных ЖГВ Н5N2 (группа 2), предвакцинальные СТГ вируснейтрализующих антител (PMH) в Д0 оказались достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями у лиц из контрольной группы (группа 3): соответственно 1:14 и 1:6.

Кратность прироста СТГ антител к вирусам А(Н5N2) и А(Н5N1) после двукратной прививки (праймирования) ЖГВ А(Н5N2) была очень низкой и не превышала 2,5. После бустирования этих лиц ИГВ (Н5N1) в 2014 г., данный показатель увеличился во много раз (15,0 – 30,0). В контрольной группе привитых только ИГВ Н5N1 он составил по

антигемагглютинирующим антителам 2,5 и 3,0, а по вируснейтрализующим – 24,5 и 12,2. СГТ антител к вакцинному вирусу А(Н5N1) и к гетерологичному вирусу А(Н5N2) у праймированных лиц оказались намного выше, чем в контрольной группе не праймированных волонтеров. Это касалось как раннего срока поствакцинального антителообразования (Д7), так и более поздних сроков (Д28 и Д56). У праймированных лиц вторая прививка увеличивала СГТ антител не столь значительно по сравнению с не праймированными волонтерами из контрольной группы.

Таблица 4.3.2 дает представление о частоте (%) конверсий титров сывороточных антител (РТГА, РМН) у тех же групп лиц.

Таблица 4.3.2

Частота конверсий титров антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих сывороточных антител после иммунизации волонтеров праймирующей ЖГВ Н5N2 и бустирующей ИГВ Н5N1.

Лабораторный тест	Штамм вируса гриппа	% лиц с конверсиями антител (АТ) и % лиц с титрами АТ ≥1:40													
		Праймированные ЖГВ Н5N2 в 2012 г. – (N=19)				Бустированные в 2014 г. ИГВ Н5N1 те же лица (N=19)				Привитые только ИГВ Н5N1 в 2014 г. – контрольной группы волонтеров (N=24)					
		Д28*	Д56*	% с титрами АТ ≥1:40		Д7*	Д28*	Д56*	% с титрами АТ ≥1:40		Д7	Д28	Д56	% с титрами АТ ≥1:40	
				Д28	Д56				Д28	Д56				Д28	Д56
РТГА	NIBRG-23	0	0	0	0	26 ¹	58 ²	73	58 ³	73 ⁴	8 ¹	29 ²	50	12 ³	29 ⁴
	А/Индонезия/05/2005 (Н5N1)	0	0	0	0	42 ⁵	63	79	63 ⁶	73 ⁷	8 ⁵	42	54	17 ⁶	38 ⁷
	А/Индюк/Турция/65/133 (Н5N2)	21	42	0	0	26 ⁸	68 ⁹	79 ¹⁰	58 ¹¹	63 ¹²	8 ⁸	25 ⁹	41 ¹⁰	13 ¹¹	21 ¹²
	А/Утка/Потсдам/86/92 (Н5N2)	21	37	0	0	37 ¹³	74 ¹⁴	74 ¹⁵	58 ¹⁶	74 ¹⁷	13 ¹³	29 ¹⁴	42 ¹⁵	17 ¹⁶	35 ¹⁷
РМН	NIBRG-23	НИ**	НИ	НИ	НИ	58	95 ¹⁸	160	89 ¹⁹	100	46	67 ¹⁸	96	46 ¹⁹	87
	А/Индюк/Турция/65/133 (Н5N2)	5	47	0	0	63	95 ²⁰	95	100 ²⁴	100	46	75 ²⁰	96	58 ²¹	92

Цифры 1-21 означают достоверные отличия % конверсий титров антител в опытной и контрольной группах 1 – p<0,05; 2 – p<0,05; 3 – p<0,01; 4 – p<0,01; 5 – p<0,01; 6 – p<0,01; 7 – p<0,05; 8 – p<0,05; 9 – p<0,01; 10 – p<0,05; 11 – p<0,01; 12 – p<0,01; 13 – p<0,05; 14 – p<0,01; 15 – p<0,05; 16 – p<0,01; 17 – p<0,05; 18 – p<0,05; 19 – p<0,05; 20 – p<0,05; 21 – p<0,01.

* Как в таблице 4.3.1

** Не исследовали

Двукратная прививка ЖГВ H5N2 в 2012 г (группа 1) не привела к образованию у людей защитных титров антител $\geq 1:40$ ни к одному из исследованных штаммов. Во многих позициях число конверсий обоих типов сывороточных антител в опытной группе 2 оказалось значительно выше, чем в контрольной. Это наблюдалось и в Д7, и в более поздние сроки после вакцинации (Д28 и Д56). У первых добавочный эффект от второй прививки ИГВ (H5N1) был менее значительным, чем у вторых. В итоге у праймированных волонтеров доля лиц с защитными титрами антител $\geq 1:40$ после первой прививки колебалась от 58 до 100%, после второй – от 63 до 100%. Аналогичные показатели в контрольной группе были существенно ниже: соответственно 12-58% и 21-92%.

Таким образом, представленные выше материалы свидетельствуют о способности праймирующей ЖГВ H5N2 активно бустировать продукцию сывороточных антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих антител к потенциально пандемическому вирусу гриппа А(H5N1) даже после однократной прививки ИГВ H5N1.

В таблице 4.3.3 приведены сравнительные сведения о частоте конверсий и интенсивности поствакцинальной продукции сывороточных IgA- и IgG-антител к вакцинному вирусу А(H5N1) у тех же людей праймированных ЖГВ H5N2 в 2012 и не праймированных этой вакциной.

По частоте конверсий этих антител, выявленных в ИФА обе группы достоверно не отличались за исключением накопления IgA-антител в Д28: соответственно 46 и 79%. Однако, во всех временных интервалах (Д7, Д28, Д56) после прививки ИГВ H5N1 СГТ как IgA-, так и IgG-антител оказались намного выше у праймированных лиц. Кратность прироста СГТ в опытной и контрольных группах составила для IgA-антител соответственно 9,2 - 11,5 и 3,0 - 3,6 раза, а для IgG-антител – соответственно 2,2 - 4,4 и 1,7-3,7 раза. Обращает на себя внимание факт значительного превышения исходных СГТ IgG-антител (Д0) у праймированных людей по сравнению с не праймированными: соответственно 1:335 и 1:170.

Таблица 4.3.3

**Частота конверсий и интенсивность продукции сывороточных IgA- и IgG-антител к
вакцинному вирусу гриппа NIBRG-23(H5N1) после иммунизации волонтеров ИГВ H5N1.**

Лабораторный тест и антитела	Группа привитых	Показатели продукции антител									
		% лиц с конверсиями антител			Обратная величина средних геометрических титров (СТГ) антител				Кратность прироста СТГ антител		
		Д7*	Д28*	Д56*	Д0*	Д7	Д28	Д56	Д7/Д0	Д28/Д0	Д56/Д0
ИФА IgA	ИГВ H5N1 (N=24)**	50	46 ¹	54	7	21	21 ⁵	25 ⁷	3,0	3,0	3,6
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 (N=19)***	79	79 ¹	79	6	55 ³	69 ⁵	60 ⁷	9,2	11,5	10,0
ИФА IgG	ИГВ H5N1 (N=24)	25	46	63	170 ²	290 ⁴	490 ⁶	635 ⁸	1,7	2,9	3,7
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 (N=19)	26	58	58	335 ²	745 ⁴	1485 ⁶	1285 ⁸	2,2	4,4	3,8

Цифры 1-8 означают достоверные отличия показателей: 1 – $p < 0,05$; 2 – $p < 0,01$; 3 – $p < 0,01$; 4 – $p < 0,001$; 5 – $p < 0,05$; 6 – $p < 0,01$; 7 – $p < 0,01$; 8 – $p < 0,01$

* Как в таблице 4.3.1

** Привитые только ИГВ H5N1.

*** Привитые ЖГВ H5N2 с последующей (через 1,5 года) прививкой ИГВ H5N1.

Материалы таблицы 4.3.4 дают представление об интенсивности продукции сывороточных IgA- и IgG-антител у тех же волонтеров к другому вирусу А (H5N2): (1) после прививки ЖГВ H5N2 в 2012 г; (2) после прививки тех же людей ИГВ H5N1 в 2014 г; (3) после прививки контрольной группы лиц в 2014 г ИГВ H5N1 без предварительного праймирования ЖГВ H5N2. В первом случае штамм вируса А (H5N2) был гомологичным, то есть вакцинным штаммом ЖГВ H5N2, в двух других – гетерологичным вакцинному вирусу А (H5N1).

Эти данные оказались идентичны результатам, полученным при исследовании гомологичного IgA- и IgG- иммунного ответа на вакцинный штамм А (H5N1) – таблица 4.3.3. Были отмечены те же особенности: во-первых, более высокие СТГ IgG-антител в предвакцинальный период (Д0) у праймированных лиц, по сравнению с не праймированными (соответственно 1:860 и 1:550), во-вторых, более

высокие СГТ антител после первой прививки (Д28) у первых, чем у вторых (соответственно 1:111 и 1:47 для IgA и 1:2390 и 1:1234 для IgG), в третьих, отсутствие дополнительного эффекта в отношении повторной вакцинации ИГВ H5N1 ранее праймированных волонтеров. Более того, в этом случае повторная прививка даже супрессировала IgA и IgG иммунный ответ у данных лиц. (для IgA – в Д28 и Д56, СГТ составил соответственно 1:128 и 1:111, а для IgG – соответственно 1:2390 и 1:1554).

Таблица 4.3.4

Интенсивность продукции сывороточных IgA- и IgG-антител к вирусу гриппа А/Индюк/Турция/65/133 (H5N2) после иммунизации волонтеров праймирующей ЖГВ H5N2 и бустирующей ИГВ H5N1.

Лабораторный тест и антитела	Обратная величина средних геометрических титров (СГТ) антител															
	Праймированные ЖГВ H5N2 в 2012 г. (N=19)				Бустированные в 2014 г. ИГВ H5N1 те же лица (N=19)						Привитые только ИГВ H5N1 в 2014 г. контрольной группы волонтеров (N=24)					
	Д0*	Д28*	Д56*	Д56/Д0*	Д0	Д7*	Д28	Д56	Д7/Д0	Д28/Д0	Д0	Д7	Д28	Д56	Д7/Д0	Д56/Д0
ИФА IgA	28	30	37	1,2	26	88 ¹	128	111 ³	3,4	4,9	21	37 ¹	47 ²	44 ³	1,8	2,2
ИФА IgG	895	1035	1240	1,4	860 ⁴	1383 ⁵	2390 ⁶	1554	1,6	2,8	550 ⁴	848 ⁵	1234 ⁶	1554	1,5	2,8

Цифры 1-6 означают достоверные отличия СГТ антител: 1 – $p < 0,01$; 2 – $p < 0,01$; 3 – $p < 0,05$; 4 – $p < 0,05$; 5 – $p < 0,05$; 6 – $p < 0,01$

* Как в таблице 4.3.1

Таким образом, бустирующий эффект в отношении сывороточных антител, выявляемых в ИФА, был хорошо выражен не только по интенсивности продукции иммуноглобулинов, специфичных к вакцинному штамму H5N1, но и к гетерологичному вирусу H5N2 с тем же гемагглютинином.

Обращает на себя внимание то, что на праймирующую иммунизацию в 2012 г, IgA и IgG ответ в ИФА оказался таким же слабым, как и ответ, сопряженный с продукцией антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих антител.

Таблица 4.3.5 включает данные по поствакцинальной продукции в ИФА у тех же волонтеров другого типа IgA- и IgG-антител к вакцинному штамму А (H5N1), а именно: секретируемых В-клетками *in vitro* в надосадках культур МПК (PРАb). И в этом случае праймирование ЖГВ H5N2 оказывало хорошо выраженный бустирующий эффект на прививку ИГВ H5N1. В большей мере это касалось секреции

IgG PPAб. Так во всех временных интервалах (Д7, Д28 и Д56) СГТ IgG-антител у праймированных волонтеров были существенно выше, чем у не праймированных. Секреция IgA-антител оказалась более слабой в обеих группах. В отличие от секреции IgG-антител, ее пик у праймированных лиц наблюдался на раннем сроке после первой прививки (Д7). При этом определение IgA- PPAб на седьмой день после первой прививки давало значительное преимущество в констатации числа их конверсий у праймированных волонтеров, по сравнению с не праймированными – соответственно 74 и 13% конверсий этих антител.

Таблица 4.3.5

Количественные показатели секреции in vitro IgA- и IgG-антител к вакцинному вирусу гриппа NIBRG-23(H5N1) после иммунизации волонтеров ИГВ H5N1.

Лабораторный тест и антитела	Группа привитых	Антитела в надосадках культур МПК (PPAb)									
		% лиц с конверсиями антител			Обратная величина средних геометрических титров (СГТ) антител				Кратность прироста СГТ антител		
		Д7*	Д28*	Д56*	Д0*	Д7	Д28	Д56	Д7/Д0	Д28/Д0	Д56/Д0
ИФА IgA	ИГВ H5N1 (N=24)**	13 ¹	13 ²	13 ³	1	2 ⁴	2	1	2,0	2,0	1,0
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 (N=19)***	74 ¹	42 ²	26 ³	1	6 ⁴	3	3	6,0	3,0	3,0
ИФА IgG	ИГВ H5N1 (N=24)	46	67	83	2	5 ⁵	8 ⁶	10 ⁷	2,5	4,0	5,0
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 (N=19)	58	68	84	4	23 ⁵	34 ⁶	37 ⁷	6,0	8,5	9,3

Цифры 1-7 означают достоверные отличия показателей: 1 – p<0,001; 2 – p<0,01; 3 – p<0,05; 4 – p<0,001; 5 – p<0,05; 6 – p<0,05; 7 – p<0,05

* Как в таблице 4.3.1

** и *** Как в таблице 4.3.3

Таблицы 4.3.6 включает материалы сравнительного анализа диагностической ценности двух тестов, применявшихся для выявления в ИФА поствакцинальных конверсий IgG-антител к вакцинному штамму А (H5N1) в сыворотках крови (сывороточные антитела) и секретируемых В-клетками в надосадках культур МПК (секретируемые PPAб). Анализировали этот процесс у праймированных и не праймированных волонтеров. Данные совпали соответственно у 66 и 63% лиц, а расхождение результатов наблюдалось соответственно у 37 и 34% людей, только по PPAб – соответственно у 32 и 25%, только по сывороточным антителам – соответственно, у 5 и 8% лиц. Это свидетельствует о том, что параллельное

использование теста для определения в ИФА РРАб давало значительный процент дополнительной информации об иммуногенности ИГВ H5N1.

Таблица 4.3.6

Сопоставление данных по фиксации в ИФА конверсий IgG-антител к вакцинному вирусу NIBRG-23 в сыворотках крови и в надосадках культур МПК у волонтеров, привитых ИГВ H5N1.

Группы	Число лиц	Данные о наличии и отсутствии конверсий антител (АТ) в двух сравниваемых тестах*			
		Совпадение результатов по наличию и отсутствию конверсий АТ в обоих тестах	Расхождение результатов по фиксации конверсий АТ в обоих тестах		
			Всего	В том числе	
				Наличие конверсий АТ в надосадках МПК и отсутствие в сыворотках крови	Наличие конверсий АТ в сыворотках крови и отсутствие в надосадках МПК
ИГВ H5N1 **	24	16 (66,3%)	8 (33,7%)	6 (25%)	2 (8,3%)
ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1**	19	12 (63,2%)	7 (36,8%)	6 (31,6%)	1 (5,3%)

* Конверсия антител в Д28 и/или Д56 по совокупности.

** Как в таблице 4.3.1.

Таким образом, приведенные в таблицах 4.3.5 и 4.3.6 данные позволяют сделать следующие выводы:

Однократная прививка волонтеров ИГВ H5N1 на фоне предшествующего праймирования ЖГВ H5N2 ускорило и усиливало продукцию не только сывороточных IgA- и IgG-антител, но и секретируемых *in vitro* РРАб тех же классов. В гораздо большей степени это касается IgG- РРАб.

Поствакцинальный гуморальный иммунный ответ волонтеров на ИГВ H5N1, фиксируемый *in vitro* (РРАб), отличался по ряду параметров от иммунного ответа *in vivo* (сывороточные антитела): более низкий уровень IgA- и IgG- РРАб, смещение пика секреции IgA- РРАб на ранний срок после первичной вакцинации (Д7).

В сравнении с выявлением поствакцинальных конверсий сывороточных IgA- и IgG-антител, определение IgG- РРАб давало значительно больший объем дополнительной информации об

иммуногенности ИГВ H5N1. Определение IgA- PPAб позволило уже на раннем сроке (Д7) после первой прививки ИГВ H5N1 выявить конверсии этих антител у 74% добровольцев. Исследование IgA- PPAб в последующие временные интервалы (Д28 и Д56) не повысили данный показатель.

Материалы таблицы 4.3.7 отвечают на вопрос, имеется ли связь между выявленными у волонтеров поствакцинальными конверсиями сывороточных антител, зафиксированными на праймирующую ЖГВ H5N2 в 2012 г. и бустирующую ИГВ H5N1 в 2014 г. Оказалось, что такая связь полностью отсутствует. Так, среди лиц с отсутствием в 2012 г. конверсий антител к вакцинному вирусу А (H5N2) показатели частоты конверсий тех же антител к вакцинному вирусу А (H5N1) в 2014 г составили в Д7, Д28 и Д56 соответственно 36, 73 и 73% (РТГА) и 70, 100 и 90%(РМН), а у людей с наличием конверсий антител в 2012 г – соответственно 13, 62 и 88% (РТГА) и 56, 100 и 100% (РМН). Таким образом, те и другие волонтеры отвечали на прививку ИГВ H5N1 в 2014 г с одинаковой частотой.

Таблица 4.3.7

Гуморальный иммунный ответ волонтеров (N=19) на праймирующую ЖГВ H5N2 в 2012 г. и бустирующую ИГВ H5N1 в 2014 г.

Лабораторный тест	Наличие (+) или отсутствие (-) конверсий антител в 2012 г к вакцинному вирусу ЖГВ H5N2*	Число лиц	Число (%) волонтеров с конверсиями антител в 2014 г. в вакцинному вирусу ИГВ H5N1**		
			Д7***	Д28***	Д56***
РТГА	+	8	1 (12,5%) ¹	5 (62,3%) ²	7 (87,5%) ³
	-	11	4 (36,4%) ¹	8 (72,8%) ²	8 (72,8%) ³
РМН	+	9	5 (55,6%) ⁴	9 (100%) ⁵	9 (100%) ⁶
	-	10	7 (70,0%) ⁴	9 (90%) ⁵	9 (90%) ⁶

* А/индюк/Турция/05/133 (H5N2)

** NIBRG-23 (H5N1)

*** Как в таблице 4.3.1

Цифры 1-6 означают отсутствие достоверного отличия показателей ($p > 0,05$)

Данные таблицы 4.3.8 дают представление об изменении авидности сывороточных IgA- и IgG-антител к вакцинному вирусу у привитых ИГВ H5N1 волонтеров, ранее праймированных и не праймированных ЖГВ H5N2

Среди праймированных, доля лиц с достоверным увеличением индексов авидности IgA- и IgG-антител после вакцинации ИГВ H5N1 составила

соответственно 41 и 55%, а среди не праймированных – соответственно, 0 и 18%. После иммунизации (Д28) средние значения индексов авидности этих антител у первых были выше, чем у вторых. Более того, у не праймированных лиц данные показатели не изменились по отношению к довакцинальному уровню (Д0).

Таблица 4.3.8

Авидность сывороточных IgA- и IgG-антител к вакцинному вирусу NIBRG-23 (H5N1) у привитых ИГВ H5N1 у волонтеров, не праймированных и праймированных ЖГВ H5N2.

Лабораторный тест и антитела	Группа привитых	Число лиц с конверсиями антител к вакцинному вирусу	Из них с достоверным увеличением индекса авидности антител (ИААТ)	Средние арифметические значения ИААТ		
				Д0 ***	Д7 ***	Д28 ***
ИФА IgA	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1**	17	7(41,2%)	72,7 ²	86,4 ²	84,9
	ИГВ H5N1 **	16	0	77,4	83,3	77,9
ИФА IgG	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1	11	6(54,5%) ¹	76,2 ³	86,2	90,6 ³
	ИГВ H5N1	17	3(17,6%) ¹	78,3	78,3	77,9 ³

Цифры 1-3 означают наличие статистически значимых отличий: 1 – $p < 0,005$; 2 – $p < 0,05$; 3 – $p < 0,05$

* ИААТ = (оптическая плотность в пробе с добавлением мочевины/оптическая плотность в той же пробе без мочевины)х100. Достоверным считается увеличение ИААТ на 15% и более

** Как в таблице 4.3.3

*** Как в таблице 4.3.1

Таким образом, праймирование людей ЖГВ H5N2 с последующим бустированием ИГВ H5N1 приводило к повышению авидности сывороточных IgA- и IgG-антител к вакцинному штамму А (H5N1), тогда как у не праймированных лиц, прививка ИГВ H5N1 не увеличивала данный качественный показатель антителогенеза.

На конечном этапе был проведен анализ Т-клеточного иммунного ответа на ИГВ H5N1 у тех же волонтеров (таблица 4.3.9). Определяли цитотоксические клетки иммунологической памяти фенотипов CD8+, CD8+Тcm и CD8+Тem, специфичные к вакцинному штамму А (H5N1).

У праймированных ЖГВ H5N2 и у не праймированных этим препаратом лиц, иммунизация ИГВ H5N1 сопровождалась повышением уровня (%) Т-клеток

данных фенотипов. Однако не было отмечено существенного преимущества в интенсивности данного процесса у первых по сравнению со вторыми. Так, после однократной вакцинации ИГВ H5N1 (Д28) у не праймированных доля CD8+, CD8+Tcm и CD8+Tem Т-клеток составила соответственно 2,05%, 1,48% и 3,83%, а у праймированных соответственно 2,22%, 1,79% и 3,82%. При этом обращает на себя внимание факт более высокого исходного уровня (Д0) изученных клеток у праймированных волонтеров, чем у не праймированных: соответственно для CD8+ 1,30 и 2,49%, для CD8+Tcm 0,86 и 1,44%, для CD8+Tem 2,23 и 3,05%.

Таблица 4.3.9

Т-клеточный иммунный ответ на иммунизацию ИГВ H5N1 у праймированных и не праймированных ЖГВ H5N2 волонтеров.

Группа привитых	Число лиц	% Т-клеток, специфичных к вакцинному вирусу NIBRG-23 (H5N1)					
		CD8+		CD8+Tcm		CD8+Tem	
		Д0*	Д28*	Д0*	Д28*	Д0*	Д28*
Не праймированные ЖГВ H5N2	24	1,30	2,05	0,86	1,48	2,23	3,83
Праймированные ЖГВ H5N2	19	2,49	2,22	1,44	1,79	3,05	3,82

* Как в таблице 4.3.1

Для проверки возможности влияния данного факта на торможение CD8+ Т-клеточного иммунного ответа на ИГВ H5N1 у праймированных лиц был проведен специальный статистический анализ полученных результатов (таблица 4.3.10). Он показал существование четко выраженной обратной зависимости между исходными уровнями данных клеток и их поствакцинальными конверсиями (чем выше изначальный уровень, тем меньше конверсий, и наоборот): коэффициенты Спирмана в Д7, Д28 и Д56 по отношению к Д0, колебались соответственно от -0,56 до -0,71; от -0,71 до -0,85 и от -0,70 до -0,84.

Таблица 4.3.10

Влияние исходного уровня специфических к вирусу гриппа А (H5N1)* CD8+Т- клеток иммунологической памяти на последующую после прививки ИГВ H5N1 интенсивность накопления этих клеток у волонтеров.

Число включенных в анализ лиц	Коэффициент Спирмана***								
	CD8+			CD8+Тcm			CD8+Тem		
	Д7/Д0	Д28/Д0	Д56/Д0	Д7/Д0	Д28/Д0	Д56/Д0	Д7/Д0	Д28/Д0	Д56/Д0
43**	- 0,66	- 0,85	- 0,80	- 0,56	- 0,71	- 0,70	- 0,71	- 0,78	- 0,84

* NIBRG-23 (H5N1)

** 24 привитых ИГВ H5N1 + 19 привитых ЖГВ H5N2 и ИГВ H5N1

*** Коэффициент отражает корреляционную зависимость между, с одной стороны, исходным уровнем (%) клеток до вакцинации (Д0), с другой, кратностью прироста уровня этих клеток через 7 дней после первой прививки (Д7), через 28 дней после первой прививки (Д28) и через 28 дней после второй прививки (д56)

Таким образом, отсутствие отличий в интенсивности CD8+ Т-клеточного иммунного ответа на ИГВ H5N1 у людей, праймированных и не праймированных ЖГВ H5N2, могло быть связано с более высоким исходным уровнем этих клеток у первых.

Резюме

Проведена проверка способности отечественной ЖГВ H5N2 стимулировать у взрослых людей долговременную Т- и В- клеточную иммунологическую память к гетерологичному потенциально пандемическому вирусу гриппа А (H5N1). Для этого лиц, праймированных 1,5 года назад ЖГВ (H5N2), дважды привили ИГВ (H5N1). Контролем служили люди, вакцинированные ИГВ (H5N1), но не праймированные ЖГВ (H5N2). В сравнении с не праймированными волонтерами, у праймированных после однократной иммунизации ИГВ (H5N1) наблюдалась ускоренная и усиленная продукция сывороточных (РТГА, РМН, ИФА), а также секретируемых in vitro РРАб. Это касалось антител к вакцинному вирусу H5N1 и к его более позднему клайду. Вторая прививка ИГВ(H5N1) не повышала ее иммуногенность. У праймированных людей IgA- и IgG-антитела (ИФА) обладали более высокой авидностью к вакцинному вирусу по сравнению с не

праймированными волонтерами. Бустирующий эффект ИГВ (H5N1) не коррелировал с данными РТГА и РМН по иммуногенности (% конверсий антител) праймирующей ЖГВ (H5N2). Перед прививкой ИГВ (H5N1) у праймированных лиц исходные уровни CD8⁺ Т-клеток иммунологической памяти, специфичных к вакцинному штамму оказались выше, чем у не праймированных. Вероятно, вследствие этого по частоте поствакцинальных конверсий Т-клеток обе группы существенно не отличались. В целом все полученные результаты обосновывают способность ЖГВ (H5N2) активно индуцировать у людей долговременную (не менее 1,5 года) иммунологическую память к потенциально пандемическому вирусу гриппа птиц А (H5N1). Это открывает новое направление в изучении возможностей использования сезонных и резервных ЖГВ для защиты от потенциально пандемических вирусов гриппа А.

Глава 4.4. Экспериментальное исследование иммунного ответа к потенциально пандемическому вирусу гриппа А(Н2N2)

В главе 4.1 приведены данные об особенностях формирования коллективного иммунитета к антропонозному потенциально пандемическому вирусу гриппа А(Н2N2), циркулировавшему в 1957-1968 гг. Эти данные отражают механизм развития у людей различных звеньев постинфекционного адаптивного гетеросубтипического иммунитета к вирусу А(Н2N2) в условиях современного эпидемического процесса. К сожалению, изучение поствакцинального иммунного ответа людей к этому возбудителю связано с строгими ограничениями на введение вирусов А(Н2N2), особенно в живом состоянии. Поэтому настоящий раздел работы был выполнен в рамках эксперимента *in vivo*. Он включал исследования на мышах на органном уровне различных составляющих Т- и В-клеточного адаптивного иммунного ответа на штаммы вируса гриппа А(Н2N2) с отличающейся патогенностью (аттенуацией) и с различными мутациями в генах, кодирующих белки PB1, PB2, PA, NP, M1, NS2 (далее в генах соответствующих белков).

Настоящий раздел работы имеет как фундаментальное, так и сугубо практическое значение. Фундаментальный аспект связан с накоплением знаний в новом направлении вирусологической иммунологии – молекулярно-генетической иммунологии вирусов. Прикладной аспект включает в себя два момента: во-первых, получение в модельном опыте сведений об особенностях развития на органном уровне иммунного ответа на вирус А(Н2N2) в зависимости от его различных биологических характеристик, а во-вторых, поиск «полезных» мутаций для повышения иммуногенности вакцинных штаммов А(Н2N2) для ЖГВ, создаваемых либо классической реассортацией, либо методом обратной генетики.

В таблице 4.4.1 приведена характеристика использованных вирусов. Изучали гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ на три группы штаммов вируса гриппа А(Н2N2). Контрольная группа (референсные вирусы) состояла

из двух штаммов: N2 (Len/17 ca) с полным набором мутаций во внутренних генах, присутствовавших в доноре аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), и N1 (Len/134 wt) – «дикий» предшественник, у которого отсутствует этот набор мутаций. Вторая группа штаммов вируса А(H2N2) состояла из вирусов, включавших по одной из девяти мутаций внутренних генов, характерных для донора аттенуации (N3-N11). Третья группа – это вирусы, содержавшие те же мутации от донора аттенуации, в комбинированном варианте (N12-N15).

Таблица 4.4.1

Характеристики штаммов вируса гриппа H2N2, использовавшихся для заражения мышей.

N п/п	Штаммы и мутации	Наличие мутаций, характерных для донора аттенуации Len/17									Репродукция вирусов (lg EID ₅₀ /мл±SD)		
		PB2		PB1		PA		NP		M1		В легких	В носовых ходах
		478	265	591	28	341	492	15	144	100			
<i>Референс-вирусы</i>													
1	Len/134 wt*											4,4 ± 1,4	2,4 ± 1,2
2	Len/17 ca*											1,9 ± 0,9	2,3 ± 0,9**
<i>Вирусы с единичными мутациями</i>													
3	PB2-V478L											3,4 ± 2,0	1,6 ± 0,9
4	PB1-K265N											4,7 ± 0,4	1,5 ± 0,6
5	PB1-V591I											5,1 ± 1,2	1,2 ± 0,0
6	PA-L28P											5,0 ± 0,3	1,2 ± 0,0
7	PA-V341L											5,4 ± 0,2	1,2 ± 0,0
8	NP-N492S											4,6 ± 1,2	2,0 ± 0,3
9	M1-I15V											2,5 ± 1,1	2,4 ± 1,0**
10	M1-F144L											4,8 ± 0,5	4,8 ± 0,4
11	NS2-M100I											4,6 ± 0,4	2,4 ± 1,2
<i>Вирусы с комбинациями мутаций</i>													
12	PB2-V478L; PB1-K265N, V591I											1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0**
13	M1-I15V, F144L											5,7 ± 0,5	1,2 ± 0,0
14	M1-I15V, F144L; NS2-M100I											4,6 ± 0,6	2,0 ± 1,4
15	PB2-V478L; PB1-K265N, V591I; NS2-M100I											1,2 ± 0,0	1,5 ± 0,5**

Серым цветом обозначено наличие мутаций

* Len/134 wt – «дикий» вирус А (H2N2); Len17 ca – полностью аттенуированный обратногогенетический аналог донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2)

** Шрифтом выделены аттенуированные штаммы с низкой репродуктивной активностью в легких по отношению к «дикому» вирусу.

Данные той же таблицы 4.4.1 отражают один из главных признаков патогенности вирусов гриппа А – способность активно размножаться в нижних

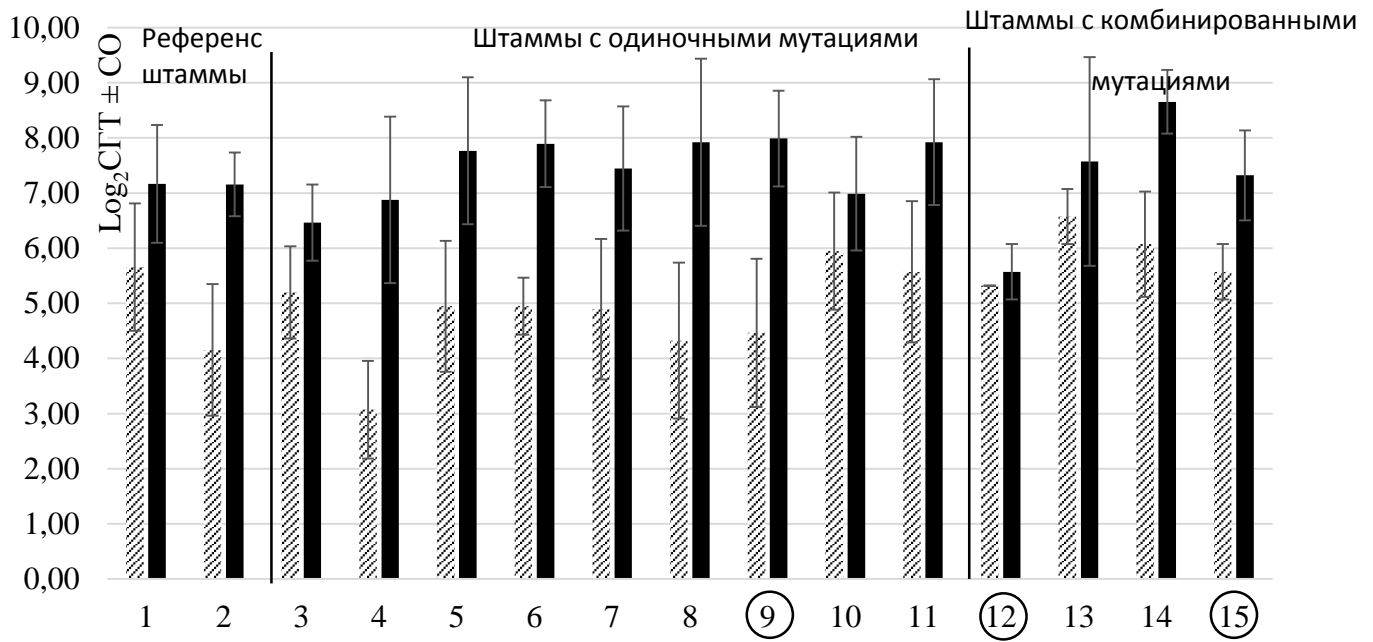
отделах дыхательного тракта (легких) мышей. Степень репродукции в верхних дыхательных путях (носовых ходах) связана с активностью развития локального иммунного ответа.

Если сравнивать показатели репродукции мутантных штаммов в легких с аналогичными данными по референс-штаммам, то большинство из них (N3 – N8, N10 – N13 и N14) активно репродуцировали в данном органе на уровне и даже выше «дикого» вируса N2 – соответственно, для этих мутантных вирусов 3,4 – 5,7 lg ETD₅₀, для «дикого» - 4,4 lg ETD₅₀. Снижение репродукции в легких, до уровня, близкого к донору аттенуации (1,9 lg ETD₅₀) продемонстрировали три штамма: N9 (2,5 lg ETD₅₀), N12 (1,2 lg ETD₅₀) и N15 (1,2 lg ETD₅₀).

По-разному мутантные штаммы размножались и в носовых ходах. Одни из них с более низкой активностью (N3 – N7 1,2 -1,6 lg ETD₅₀), чем донор аттенуации (N2 2,3 lg ETD₅₀), другие (N9, N14) на том же уровне или даже выше. Для большинства штаммов с одиночными мутациями повышенная активность размножения в легких сопровождалась снижением способности размножаться в носовых ходах (N3 – N8, N13). Штаммы N10, N11 и N14 активно репродуцировались в обоих органах. Единственным штаммом с пониженной репродукцией в легких и достаточно высокой репродукцией в носовых ходах оказался штамм N9 с единичной мутацией в белке M1.

Таким образом, по признаку размножения в легких одиночные мутации в генах внутренних белков PB2, PB1, PA, NP и NS2 не приводили к аттенуации соответствующих штаммов. Одиночная мутация в гене M1 (I15V) обеспечивала достаточную аттенуацию штамма (N9) с сохранением его высокой активности репродукции в носовых ходах. Комбинированные мутации в генах PB2 и PB1 резко аттенуировали вирус, тогда как комбинированные мутации в генах M1 и NS не влияли на этот показатель.

Рисунок 4.4.1 дает представление об индукции приведенными в таблице 4.4.1 штаммами сывороточных антигемагглютинирующих антител через 28 дней после первой иммунизации (Д28) и через 28 дней после второй иммунизации (Д56).



Нумерация вирусов – как в таблице 4.4.1., кружками обведены штаммы с низкой репродукцией в легких

Серые столбики – через 28 дней после первичной иммунизации (Д 28); черные столбики – через 28 дней после повторной иммунизации (Д 56).

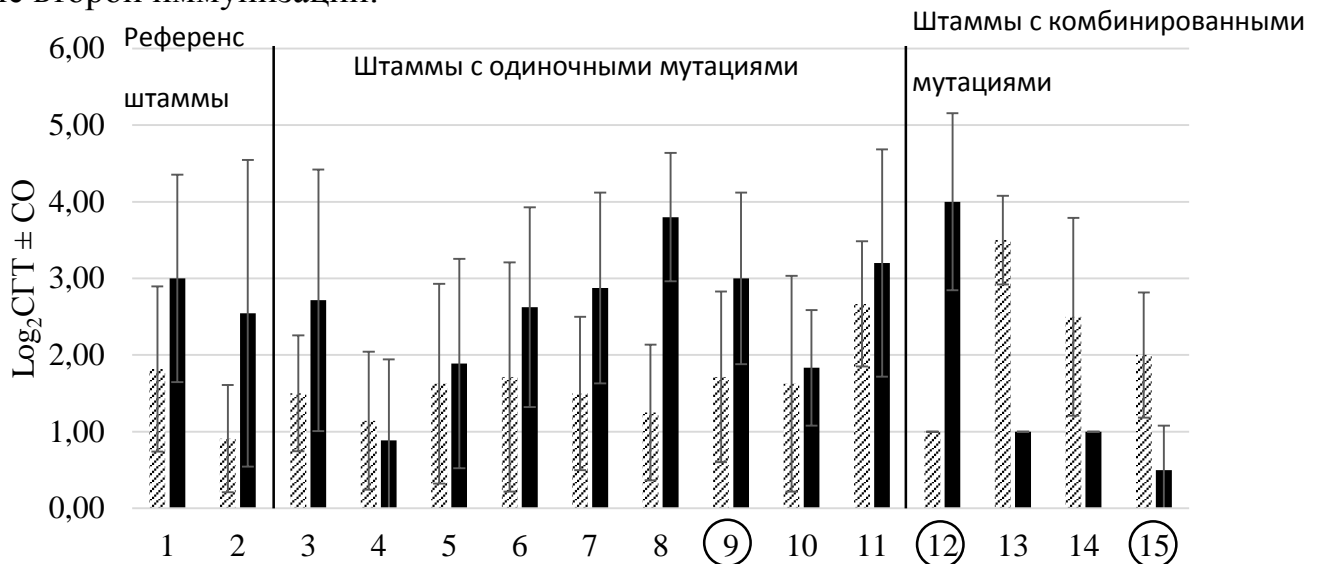
Данные представлены как \log_2 средних геометрических титров (СГТ) \pm стандартное отклонение (SD).

Рисунок 4.4.1. Продукция сывороточных антигемагглютинирующих антител (РТГА) после первичной и повторной иммунизации.

В абсолютном большинстве случаев повторная иммунизация увеличивала показатели продукции этих антител. Первичный иммунный ответ на штаммы с одиночными и комбинированными мутациями отличались значительным полиморфизмом. Одни штаммы индуцировали накопление антител на уровне «дикого» вируса (N10, N11, N13 – N15), почти все – на уровне или выше донора аттенуации (N3, N5 – N15), и только один (N4) - ниже этого уровня. Повторная иммунизация сглаживала отличия. Так, за исключением штамма N12, все мутантные вирусы индуцировали продукцию антител не хуже, чем «дикий» вирус.

Иную картину представляли данные о поствакцинальной продукции локальных IgA-антител к тем же штаммам (Рисунок 4.2.2).

Повторные введения штаммов N1 – N12 увеличивало уровни этих антител по отношению к данным, зафиксированным после первой иммунизации. Однако, штаммы N13 – N15 показали другие результаты – резкое падение титров антител после второй иммунизации.



Нумерация вирусов – как в таблице 4.4.1.

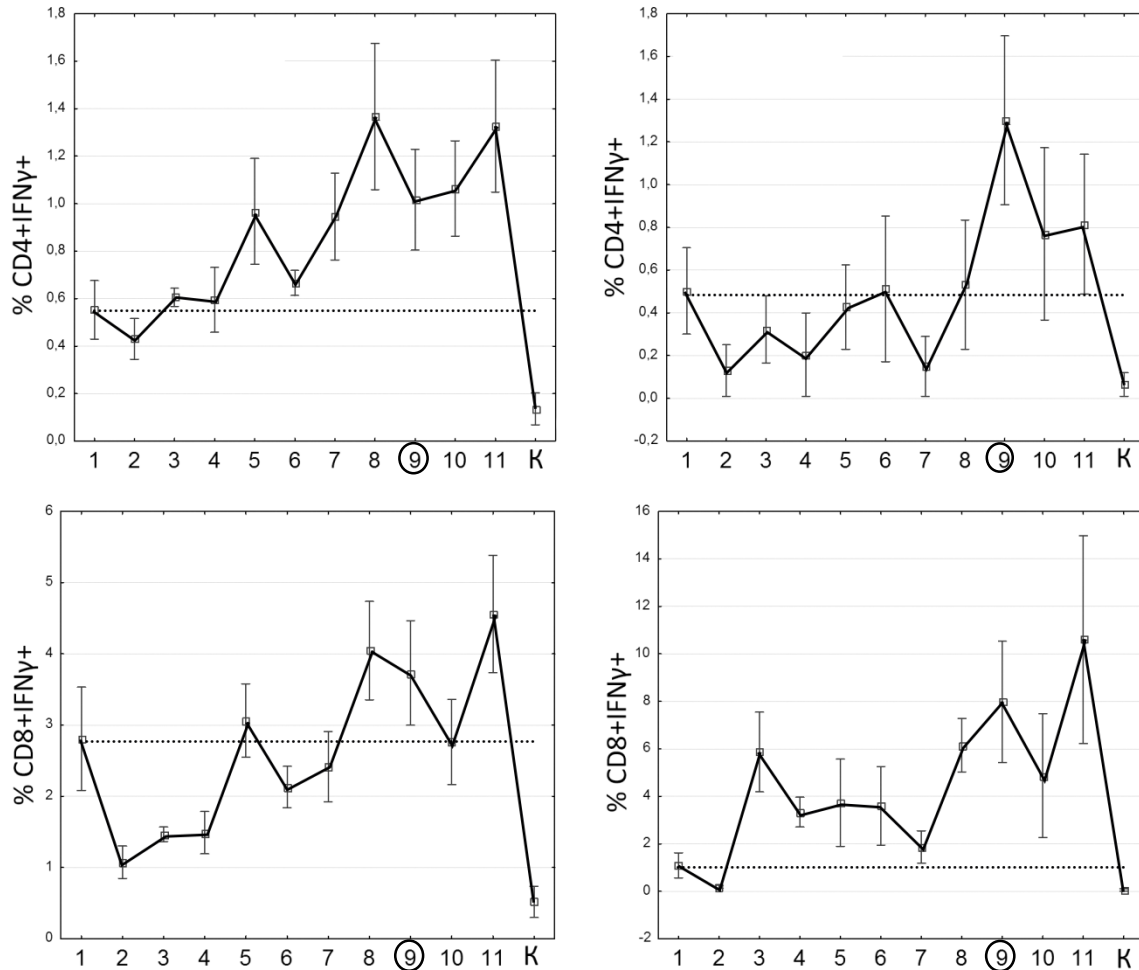
Серые столбики – через 28 дней после первичной иммунизации (Д 28); черные столбики – через 28 дней после повторной иммунизации (Д 56).

Данные представлены как \log_2 средних геометрических титров (СГТ) \pm стандартное отклонение (СО).

Рисунок 4.4.2. Продукция локальных IgA-антител (ИФА) в верхних дыхательных путях после первичной и повторной иммунизации.

Отмечен значительный разброс в количественных показателях антителогенеза к мутантным штаммам не только после первичной, но и после вторичной иммунизации. Такие колебания оказались более выраженными, чем в данных о продукции сывороточных антигемагглютинирующих антител (рисунок 4.4.1). В индукции локальных IgA-антител «дикому» вирусу (N1) не уступали, а в ряде случаев и превосходили мутантные штаммы N6, N9, N11 N13 – N15 (первичный иммунный ответ) и N9, N11, N12 (вторичный иммунный ответ).

Рисунок 4.4.3 содержит данные о системных (селезенка) и локальных (НАЛТ) вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточных иммунных ответах мышей на двукратное введение референс – вирусов и штаммов с одиночными мутациями.



Нумерация вирусов – как в таблице 4.4.1., кружком обведены штаммы с низкой репродукцией в легких.

Данные представлены в виде средних значений (квадраты) ± стандартная ошибка.

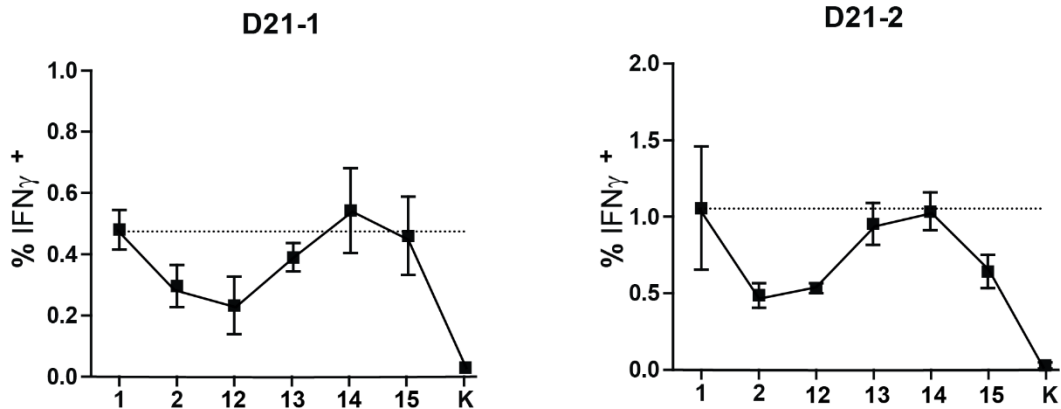
К – интактные мыши.

Рисунок 4.4.3. CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки в селезенке и НАЛТ после повторной иммунизации вирусами с единичными мутациями.

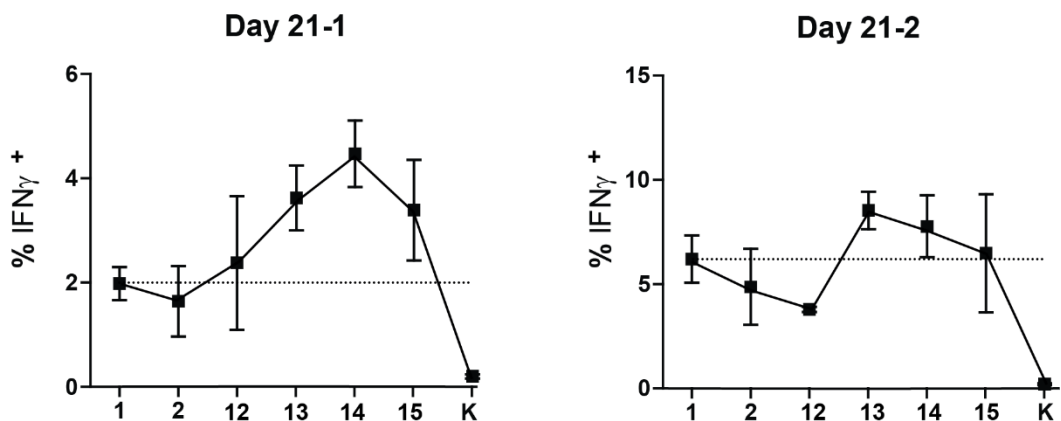
Донор аттенуации N2 уступал дикому вирусу не только в силе индукции гуморального иммунного ответа (рисунки 4.4.1 и 4.4.2), но и Т-клеточного, формируемого как в селезенке, так и в НАЛТ. Имелись значительные отличия в стимуляции изученных клеток разными мутантными штаммами. Так, вирусы с мутациями в M1, NP и NS2 генах (N8 – N11) стимулировали продукцию системных

CD4⁺ Т-лимфоцитов (селезенка) и локальных CD8⁺ Т-лимфоцитов (НАЛТ) в 2-3 раза интенсивнее, чем «дикий» вирус N1. То же самое, но в меньшей степени можно отметить в отношении поствакцинальной продукции системных CD4⁺ и локальных CD8⁺ Т-клеток, специфичных к введенным вирусам (соответственно N8, N9, N11 и N9 – N11). По отношению к «дикому» вирусу N1, штаммы N3 – N7 либо не оказывали влияния, либо понижали локальный CD4⁺ и системный CD8⁺ - клеточные иммунные ответы.

CD4⁺ Т-лимфоциты



CD8⁺ Т-лимфоциты



Нумерация вирусов – как в таблице 4.2.1.

Данные представлены в виде средних значений (квадраты) \pm стандартная ошибка.

К – интактные мыши.

Д21-1: на 21-й день после 1-й иммунизации; Д21-2: через 21 день после 2-й иммунизации.

Рисунок 4.4.4. CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки (%) в селезенке мышей при первичном и вторичном иммунном ответе на вирусы гриппа А (H2N2) с комбинациями мутаций.

Таким образом, одномутантные штаммы диаметрально отличались по интенсивности стимуляции вирусспецифических системных и локальных CD4+ и CD8+ Т-клеток.

Отдельно было проведено изучение первичного и вторичного системного (селезенка) вирусспецифического Т-клеточного иммунного ответа мышей на референс-вирусы и штаммы с комбинациями мутаций в генах PB1 и PB2, M1 и NS (рисунок 4.4.4)

Повторное введение всех штаммов повышало уровень CD4+ и CD8+ клеток (см. масштаб графиков). Донор аттенуации N2 уступал «дикому» вирусу N1 в интенсивности стимуляции данных клеток и при первичном и при вторичном ответах. Как и в случае с единичными мутациями (вирусы N9 и N10, штаммы с мутациями в гене M1 (N13 и N14) обладали наибольшей активностью в индукции CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов при первичном и вторичном иммунных ответах. В этом качестве они не уступали «дикому» вирусу N1. По отношению к нему штамм, содержащий **D21-1** только в генах полимер **D21-2** мплекса (N12), понижал продукцию этих клеток.

Таким образом, все изученные штаммы индуцировали вирусспецифический Т-клеточный иммунный ответ, но с разной интенсивностью.

В таблице 4.4.2 представлены обобщающие данные по интенсивности гуморального (сывороточные и локальные антитела) и вирусспецифического Т-клеточного (системные и локальные CD4+ и CD8+ лимфоциты) иммунного ответа мышей на мутантные вирусы N3 – N15. Эти показатели оценивали в сопоставлении с аналогичными данными по эталонному иммунному ответу к «дикому» вирусу N1.

Суммарная оценка интенсивности гуморального и Т-клеточного иммунного ответа мышей на мутантные штаммы вируса гриппа А.

Факторы иммунитета	Мутации	Номера мутантных штаммов с равной, повышенной или пониженной интенсивностью иммунного ответа по отношению к иммунному ответу к «дикому» вирусу N1	
		Равная или повышенная	Сниженная
Сывороточные антитела (РТГА)	Одиночные + комбинированные	4,5,6,7,8, 9 ,10,11,13,14, 15	3, 12
Локальные IgA-антитела (ИФА)	Одиночные + комбинированные	8, 9 ,11, 12	3,4,5,6,7,10,13,14, 15
CD4+ – селезенка	Одиночные + комбинированные	3,4,5,6,7,8, 9 ,10,11,13,14	12 , 15
CD4+ – НАЛТ	Одиночные	6,8, 9 ,10,11	3,4,5,7
CD8+ – селезенка	Одиночные + комбинированные	8, 9 ,10,11, 12 ,13,14, 15	12
CD8+ – НАЛТ	Одиночные	3,4,5,6,7,8, 9 ,10,11	Нет

Штаммы, выделенные жирным шрифтом и подчеркиванием:

- N9 – одиночная мутация M1 – I15V
- N12 – комбинированные мутации PB2 – V478L; PB1 – K265N, V591I
- N15 – комбинированные мутации PB2 – V478L; PB1 – K265N, NS2 – M100 I

Репродукция данных штаммов в легких составляет 1,2 – 2,5 lg EID₅₀

Репродукция в легких остальных штаммов составляет 3,4-5,7 lg EID₅₀

С позиции подбора вакцинных штаммов для ЖГВ H2N2 представляли интерес только мутантные вирусы, обладающие достаточной аттенуацией, то есть низкой способностью размножаться в легких. Таковыми являлись лишь три из тринадцати изученных мутантных вариантов: N9, N12 и N15. Первый из них с одиночной мутацией в гене M1, два других – с комбинированными мутациями в генах PB1 и PB2; PB1, PB2 и NS2.

По отношению к эталонному вирусу N1 штамм N12 не уступал или превосходил его в индукции только локальных антител, штамм N15 – в индукции сывороточных антител и CD8+ Т-спленоцитов, а штамм N9 – по всем изученным факторам адаптивного иммунитета. При этом, в отличие от штаммов N12 и N15, штамм N9 не снижал интенсивность продукции этих факторов в сопоставлении с «диким» вирусом N1.

Таким образом, с точки зрения вакцинного дела, в качестве материала для приготовления ЖГВ наибольшее внимание привлекает штамм N9, имевший

одинокую мутацию от донора аттенуации в гене M1 (I15V), поскольку он обладал высокой иммуногенностью в отношении индукции всех звеньев адаптивного иммунитета при сохранении уровня аттенуации, близкого к донору аттенуации. Другие аттенуирующие мутации (N12 и N15) приводили либо к повышению, либо к снижению интенсивности различных факторов адаптивного иммунного ответа в сравнении с «диким» вирусом N1. В целом, полученные в этом разделе материалы свидетельствуют о влиянии изученных мутаций на формирование различных составляющих первичного и вторичного адаптивного иммунного ответа к вирусу гриппа A(H2N2).

Резюме

В эксперименте на мышах проведено исследование иммуногенных свойств различных вариантов потенциально пандемического антропонозного вируса A(H2N2), циркулировавшего в 1957-1968 гг. Сравнивали иммуногенные свойства: (i) «дикого» вируса A(H2N2), (ii) производного от него донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)? (iii) набора из 9 штаммов с привнесенными методом обратной генетики одиночными мутациями PB2, PB1, PA, NP, M1 и NS, характерными для донора аттенуации, (iv) набором из обратногогенетических штаммов с комбинациями тех же мутаций в генах. Исследовали следующие факторы адаптивного противогриппозного иммунитета: системный гуморальный (сывороточные антитела), локальный гуморальный (локальные IgA-антитела), системный Т-клеточный (вирусспецифические CD4+ и CD8+ Т-спленоциты), локальный Т-клеточный (вирусспецифические CD4+ и CD8+ - лимфоциты в НАЛТ).

Хорошо выраженный Т- и В- клеточный иммунный ответ развивался на «дикий» вирус A(H2N2). Повторная иммунизация этим вирусом значительно усиливала этот ответ. По большинству показателей донор аттенуации (полный набор мутаций) уступал «дикому» вирусу (отсутствие этих мутаций) в индукции различных звеньев адаптивного иммунитета. Внесение в «дикий» вирус одиночных мутаций в перечисленных выше генах от донора аттенуации не приводило к

аттенуации этих штаммов (N3 – N8 и N10 – N11), за исключением одной позиции – перенос мутации I15V в ген M1 (штамм N9). Комплексные мутации в генах PB1 и PB2, инкорпорированные в дикий вирус от донора аттенуации, обеспечивали аттенуацию данных штаммов. Интенсивность как первичного, так и вторичного иммунных ответов ко всем мутантным штаммам характеризовалась значительными колебаниями. В большей степени это касалось продукции локальных антител и вирусспецифических Т-клеток фенотипов CD4+ и CD8+. Наличие таких колебаний свидетельствует о влиянии изученных мутаций на формировании адаптивного иммунного ответа к вирусу A(H2N2). Все аттенуированные вирусы гриппа A(H2N2) (N9, N12 и N15) сохранили способность к активной индукции В- и Т- клеточного иммунного ответа, но N12 и N15 лишь его отдельных составляющих, тогда как штамм N9 (мутация I15V в гене M1) – всех звеньев, то есть системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного.

5. Обсуждение полученных результатов

Вирусологическое сообщество, занимающееся проблемой гриппа, находится в постоянном ожидании появления нового пандемического вируса гриппа А. По определению ВОЗ, к потенциально пандемическим относятся птичьих вирусы с гемагглютиниными Н5, Н6, Н7 и Н9 и антропонозный вирус гриппа А (Н2N2), имевший пандемическое распространение в 1957 – 1968 гг. [26-28]. Разработанный данной организацией Глобальный план мероприятий по борьбе с потенциально пандемическими вирусами [26-28] включает два главных направления: (i) создание резервных вакцин против этих вирусов, (ii) углубленное изучение их молекулярной биологии, генетики и иммунологии.

Настоящая работа посвящена исследованию иммунологии потенциально пандемических вирусов гриппа А. В процессе выполнения работы основное внимание было сосредоточено на поисках ответов на следующие основополагающие, но малоизученные вопросы:

1. Каковы особенности формирования у людей гетеросубтипического иммунитета к потенциально пандемическим вирусам гриппа А в условиях современного эпидемиологического процесса?
2. В чем заключаются особенности развития поствакцинального гомологичного и гетеросубтипического иммунного ответа к тем же вирусам?
3. Способны ли гриппозные вакцины, приготовленные из птичьего вируса гриппа А, индуцировать у людей долговременную иммунологическую память, то есть главный фактор адаптивного иммунитета?
4. Влияют ли мутации в генах внутренних белков вируса гриппа А на количественные характеристики адаптивного иммунного ответа?

Совокупность этих вопросов определила цель исследования и поставленные задачи. Каждый вопрос отражен в соответствующей главе собственных исследований. Основное внимание было сосредоточено на изучении различных факторов иммунной защиты к трем подтипам вируса гриппа А: наиболее опасному

птичьему H5N1, вакцинному H5N2 того же происхождения и человеческому H2N2, как наиболее вероятному рециркулянту.

Коллективный иммунитет является важнейшим звеном эпидемического процесса при острых респираторных инфекциях, в том числе и при гриппе. Именно он определяет активность распространения того или иного подтипа вируса и тяжесть поражения населения. В этом плане потенциально пандемические вирусы гриппа А не составляют исключения. Поэтому нами было проведено комплексное исследование у людей различных звеньев адаптивного иммунитета (системный, локальный, Т-клеточный) к птичьим (H5N1, H5N2) и человеческому (H2N2) вирусам (Глава 4.1). Ранее подобные целенаправленные комплексные исследования не проводились.

Показано (табл. 4.1.1 и 4.1.2), что у различных возрастных контингентов от 18 до 84 лет не обнаруживаются сывороточные антигемагглютинирующие и вируснейтрализующие антитела к птичьим вирусам H5N1 и H5N2, но выявляются локальные IgA-антитела к этим вирусам в СВДП и слюне, и даже в защитных титрах. Отсутствие у обследованных лиц сывороточных антител к вирусу гриппа А (H5N1) отмечено и другими авторами в исследованиях, проводившихся в начале его распространения среди людей [40]. Этот факт и послужил базисом для утверждения, опубликованного во многих изданиях, о полной неиммуности человеческой популяции к птичьим вирусам гриппа А [52, 172, 200]. Однако тестирование состояния локального иммунитета не проводилось, хотя это звено адаптивного иммунитета играет главную роль в прямой нейтрализации вируса во входных воротах гриппозной инфекции [25].

Ранее было показано существование прямой зависимости между возрастом людей и титрами у них локальных IgA-антител к актуальным вирусам гриппа А (H1N1) и А (H3N2) [3, 12]. Этот вопрос в отношении птичьих вирусов оставался открытым. Наши данные (Табл. 4.1.2) о распределении титров локальных IgA-антител к вирусу гриппа птиц А (H5N2) у лиц разного возраста от 18 до 84 лет показали наличие точно такой же зависимости, то есть, с увеличением возраста, возрастали и СГТ этих антител. Однако привлекает внимание другой момент –

довольно значительные отличия в обнаружении в СВДП IgA-антител у лиц, родившихся до и после 1968 г., то есть у соответственно праймированных и не праймированных вирусом гриппа А (H2N2) в 1958 – 1968 гг. Так, у первых СГТ локальных антител был намного выше, чем у вторых. Данное обстоятельство можно объяснить только с точки зрения существования праймирующего эффекта вирусом гриппа А (H2N2) на формирование гуморального иммунитета к птичьим вирусам. Сравнительно недавно было показано присутствие общих иммунодоминантных CD4⁺ Т-клеточных эпитопов в составе гемагглютининов H5 и H2 [159, 206]. Известно, что эти клетки участвуют в регуляции локального гуморального иммунного ответа [25].

Нами показано (Табл. 4.1.5), что эпидемия гриппа А (H1N1) сопровождалась повышением у обследованной группы лиц СГТ локальных IgA-антител не только к ее возбудителю, но и к не циркулирующим вирусам с гемагглютинидами H5, хотя и с меньшей интенсивностью. Эти данные иллюстрируют механизм формирования гетеросубтипического локального гуморального иммунитета населения (кроссреактивные IgA-антитела) в естественных условиях эпидемиологического процесса при циркуляции актуальных подтипов вируса гриппа А. Скорее всего, выявляемый в ИФА пул кроссреактивных локальных IgA-антител индуцируется общими для всех подтипов вируса гриппа А перекрестнореагирующими иммунодоминантными эпитопами, присутствующими в составе консервативных структур вирусных белков. В отличие от этого, в РТГА и РМН тестируются преимущественно штаммоспецифические антитела к пластичным антигенным детерминантам гемагглютинина. Иными словами, пул антител, выявляемых в ИФА, намного шире спектра антител, определяемых в РТГА и РМН.

Наши результаты (Табл. 4.1.1) показали, что перед вступлением в циркуляцию вируса гриппа А (H1N1) pdm 2009 у взрослых людей были весьма низкие СГТ сывороточных антител (РТГА), но очень высокие СГТ локальных IgA-антител. По американским данным, в этот период сывороточные антитела (РТГА, РМН) выявлялись в довольно низких титрах ($\leq 1:20$) только у пожилых людей старше 65 лет и отсутствовали у всех остальных [38]. На основании только этих

данных было декларировано положение о полном отсутствии иммунитета к вирусу гриппа А (H1N1) pdm 2009 у подавляющей части населения, что может привести к глобальным катастрофическим последствиям для человечества [32, 100, 157]. Однако этот прогноз не оправдался, поскольку пандемия гриппа А (H1N1) pdm 2009 носила весьма умеренный характер [194, 213]. Вполне вероятно, что в снижении интенсивности эпидемического процесса в эпидемию гриппа А (H1N1) 2009 – 2010 гг. сыграло роль наличие у людей хорошо выраженного локального иммунитета, опосредованного IgA-антителами. Высокий уровень этих антител поддерживался у людей предшествовавшими контактами (инфекция, вакцинация) со штаммом того же подтипа А (H1N1).

В 2011 г. появились сообщения о локальных заболеваниях людей свиным вирусом гриппа А/Индиана/10/2011(swH3N2) с инкорпорированным геном матриксного белка от вируса гриппа А (H1N1)pdm2009 [55, 69]. В связи с этим настораживающим фактором даже возник вопрос о создании специальной вакцины против этого вируса. Проведенные нами исследования (Табл. 4.1.6) показали, что по возрастной профиль уровня выявленных сывороточных антигеммагглютинирующих антител к человеческому и данному свиному вирусам гриппа А (H3N2) почти полностью совпадает. Это свидетельствует, что иммунная система людей практически не отличает оба вируса, то есть при встрече человека с актуальным вирусом гриппа А (H3N2) В-клетки секретируют антитела не только против него, но и против свиного варианта этого вируса. Учитывая факт длительной циркуляции вирусов гриппа А(H3N2) и, как следствие, формирование к нему мощной иммунологической памяти у населения, зоонозные вирусы с аналогичными антигенными формулами не имеют шанса вызвать тяжелые пандемии. Это подтвердилось в отношении «свиного» вируса А(H1N1)pdm 2009. Об этом же свидетельствуют не только наши, но и зарубежные данные об обнаружении антител к вирусу гриппа свиней А(swH3N2) [116].

Вирус гриппа А (H2N2) считается наиболее вероятным претендентом на новый рециркуляционный цикл [146, 148]. Нами изучено состояние гуморального

иммунитета к этому вирусу в двух группах людей: встречавшихся с ним в 1957-1968 гг. и родившихся после 1968 г., то есть у не праймированных лиц.

Сывороточные антигемагглютинирующие антитела к вирусу А (H2N2) у праймированных лиц фиксировались в довольно высоких титрах, а у не праймированных они отсутствовали (Табл. 2.2.3 и 2.2.4). Эти данные подтверждают сохранение хорошо выраженной системной В-клеточной иммунологической памяти к данному возбудителю у людей, встречавшихся с ним ранее. В отличие от антигемагглютинирующих, локальные IgA-антитела выявлялись и у праймированных, и у не праймированных людей, но у первых их уровень был выше, чем у вторых. Это свидетельствует, что существует не только долговременная системная, но и долговременная локальная В-клеточная иммунологическая память. По сравнению с системной памятью ее некоторая стертость проявления объясняется за счет фиксации в ИФА у не праймированных лиц кроссреактивных IgA – антител к общим антигенным структурам вируса гриппа А. Ранее существование долговременной локальной В-клеточной памяти относили к неизученной проблеме [25].

Доказано, что вирусспецифические CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты являются факторами противогриппозного иммунитета [75, 208] Функция первых (хелперов) в большей степени заключается в регуляции В-клеточного иммунного ответа, а вторых (ЦТЛ) в цитотоксическом клиренсе организма от зараженных клеток [93, 112]. В этой связи нами проведено тестирование у взрослых людей вирусспецифических Т-клеток иммунологической памяти (фенотипы CD4⁺, CD8⁺, CD8⁺Tcm и CD8⁺Tem) к потенциально пандемическим вирусам гриппа А (H2N2) и А (H5N1) – Рисунок 4.1.1. Полученные данные четко свидетельствуют о наличии у части обследованных лиц этих клеток, специфических ко всем перечисленным вирусам. Такие кроссреактивные клетки стимулируются при контактах с актуальными вирусами А(H1N1) и А(H3N2) за счет наличия консервативных иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов в структуре гемагглютинина, нейраминидазы, матриксного белка и нуклеопротеина у всех подтипов вируса гриппа А [80]. Ранее отечественными и американскими авторами показано

существование у взрослых людей CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, специфичных к некоторым другим потенциально пандемическим вирусам: А (H7N3) и А (H7N9) [52, 164, 165, 201].

Обобщая представленные в главе 4.1 материалы, можно отметить следующее:

Впервые проведено комплексное исследование у взрослых людей состояния системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного иммунитета к потенциально пандемическим антропонозному А (H2N2) и птичьему А (H5N2) вирусам гриппа. Собственные и литературные данные по этому вопросу позволяют сделать ряд выводов, а именно:

У людей, контактировавших с вирусом гриппа А (H2N2) в 1957 – 1968 гг. сохранена в активном состоянии системная и локальная В-клеточная иммунологическая память к этому подтипу. Данное обстоятельство подтверждается обнаружением у таких лиц высоких титров антигемагглютинирующих антител (РТГА) и локальных IgA-антител (ИФА) к указанному подтипу.

У людей, не контактировавших с этими вирусами, отсутствует системный гуморальный иммунитет к данным возбудителям, опосредованный сывороточными антигемагглютинирующими и вируснейтрализующими антителами. Однако у этих людей обнаруживаются такие составляющие гетеросубтипической иммунной защиты, как кроссреактивные локальные IgA-антитела (локальная В-клеточная память) и кроссреактивные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, специфические к этим вирусам (Т-клеточная память). Продукция этих антител и Т-клеток поддерживается за счет контактов с актуальными подтипами вируса гриппа А. Индукторами данных антител и клеток являются консервативные участки белков вириона, имеющиеся у всех подтипов вируса гриппа А вне зависимости от их хозяина. У праймированных лиц активность стимуляции кроссреактивных локальных IgA-антител к вирусам с гемагглютиниринами H2 и H5 находятся в прямой зависимости от их возраста, то есть, чем больше возраст, тем выше титры.

И, наконец, о самом главном вопросе, требующем отдельного обсуждения – существует ли естественно приобретенная иммунная защита людей от потенциально пандемических зоонозных вирусов гриппа А в случае полного преодоления ими межвидового барьера с беспрепятственной передачей от человека к человеку? Абсолютно точно ответить на этот вопрос можно только при развертывании реальных событий. Но, на наш взгляд, существуют три важных момента, которые склоняют в пользу утвердительного ответа.

Во-первых, на примере пандемии гриппа А (H2N2) 1957-1968 гг. доказано, что люди с высоким уровнем сывороточных антител к предшествующему варианту, то есть к вирусу гриппа А (H1N1), были защищены значительно лучше, чем лица, у которых эти антитела отсутствовали, либо их титр был низким [83]. В данном случае сывороточные антитела являлись не столько прямыми протекторами, сколько маркерами общего состояния гетеросубтипического иммунитета, в том числе опосредованного кроссреактивными локальными антителами и вирусспецифическими Т-клетками. Но в то время, естественно, исследования этих факторов иммунитета не могли проводиться. По аналогии с высокой долей вероятности можно предположить, что данный феномен может иметь место при пандемическом распространении любых новых сероподтипов вируса гриппа А, в том числе и зоонозных с полностью отличающейся антигенной формулой. В этом случае наличие перекрестнореагирующих В- и Т-клеток может служить фактором, смягчающим тяжесть пандемии.

Во-вторых, пандемическое распространение «свиного» вируса гриппа А (H1N1) pdm 2009 отнюдь не сопровождалось предсказываемыми катастрофическими последствиями. В этом случае относительная мягкость пандемии была связана с наличием у большинства населения иммунитета, приобретенного вследствие длительной циркуляции предшествующих штаммов данного подтипа вируса [8]. Это показано нами на примере состояния локального (Табл. 4.2.1) и Т-клеточного [16] иммунитета у взрослых людей перед началом его эпидемического распространения. Также по аналогии можно предсказать, что при «прорыве» в человеческую популяцию зоонозного вируса гриппа А с антигенной

формулой, полностью совпадающей с циркулирующим вирусом, не следует ожидать тяжелой эпидемии.

В-третьих, обнаруженные нами кроссреактивные локальные антитела и вирусспецифические Т-клетки к птичьим подтипам вируса гриппа А должны снижать тяжесть эпидемического процесса, если эти вирусы начнут глобальное распространение среди людей. В большей степени это касается птичьих вирусов с общей с циркулирующим вирусом нейраминидазой.

Таким образом, по нашему глубокому убеждению, гетеросубтипический локальный гуморальный и Т-клеточный противогриппозный иммунитет является мощным природным фактором защиты человеческой популяции при внедрении в нее любых новых шифтовых вариантов вируса гриппа А, включающих все известные подтипы, в том числе и зоонозные. Однако он не столь совершенен, как гомологичный иммунитет, так как его воздействие ограничивается клиренсом вируса и смягчением инфекционного процесса [15, 22]. Но и в этом случае его роль велика, поскольку при полном его отсутствии заражение людей сопровождалось бы очень высокой летальностью и даже почти поголовным вымиранием, как это наблюдалось в 16 – 19 веках при заносах гриппа в длительно изолированные коллективы аборигенов Латинской Америки и отдаленных островов. Сказанное ни в коей мере не отрицает значения вакцинопрофилактики населения против потенциально пандемических вирусов гриппа А. Безусловно, такие резервные вакцины необходимы, поскольку они индуцируют у людей более совершенный тип иммунитета – гомологичный штаммоспецифический. Знания о закономерностях естественно приобретенного гетеросубтипического иммунитета к этим возбудителям и периодический мониторинг данного процесса нужны для прогнозирования особенностей развития эпидемического процесса, а, следовательно, и объема профилактических мероприятий среди разных возрастных групп населения в случае возникновения угрожающей ситуации. Кроме того, в этом случае данные о постинфекционной и поствакцинальной индукции гетеросубтипического иммунитета разными подтипами вируса гриппа А могут ориентировать в оптимальном выборе уже имеющихся сезонных и резервных

вакцин для экстренной профилактики гриппа в зависимости от антигенной формулы нового пандемического варианта.

Изучив особенности формирования у людей постинфекционного гетеросубтипического иммунитета к птичьим вирусам гриппа А с гемагглютинином Н5 (Глава 4.1), мы попытались ответить на второй поставленный вопрос: в чем заключаются особенности развития у людей поствакцинального иммунного ответа к этим птичьим вирусам (Глава 4.2.)? Исследование данного вопроса проводилось на материале, полученном при оценке иммуногенности отечественной резервной ЖГВН5Н2 с точки зрения ее способности индуцировать у волонтеров разные звенья иммунной защиты (системный гуморальный, локальный гуморальный и Т-клеточный иммунитет) к гомологичному Н5Н2 и гетерологичным потенциально пандемическим вирусам Н5Н1 и Н7Н3

В отношении частоты (%) поствакцинальных конверсий антител (Табл. 4.2.1) отмечено два важных факта. Первый из них – в сравнении с данными после однократной иммунизации, повторная прививка увеличивала число лиц с конверсиями тех или иных изученных типов антител, что свидетельствует о необходимости двукратного введения ЖГВН5Н2. Второй факт – довольно низкие показатели РТГА, то есть регламентированного теста для оценки иммуногенности ЖГВ (38% конверсий титров антигемагглютинирующих антител), по сравнению с кумулятивными данными по всем применявшимся тестам (79% конверсий титров всех антител). Это еще раз иллюстрирует тезис о недостаточности использования только РТГА для учета гуморальных поствакцинальных иммунных реакций людей на противогриппозную вакцинацию, особенно на ЖГВ [16, 23].

Нами показано, что на двукратное введение ЖГВН5Н2 у волонтеров развивался довольно слабый по интенсивности гуморальный иммунный ответ, выраженный в СГТ локальных и, в большей степени, сывороточных антител к вакцинному штамму (Табл. 4.2.2 и 4.2.3). Аналогичный феномен отмечен и зарубежными учеными при оценке иммуногенности американских ЖГВ Н5Н1, Н7Н7, Н9Н2 [45, 99, 140]. Во всех цитированных работах поствакцинальные титры антител оказались существенно ниже, чем это наблюдалось после иммунизации

сезонными ЖГВ [79, 204] и ЖГВ А (H1N1) pdm 2009 [88, 151]. Более слабый по интенсивности гуморальный иммунный ответ на ЖГВ, приготовленные из птичьих вирусов гриппа А, гипотетически связывают с тормозящим влиянием на их репродукцию предсуществующих факторов иммунитета у прививаемых людей, а именно: (i) антител к общей нейраминидазе у вакцинного и циркулирующего вирусов; (ii) моноклональных антител к консервативному иммунодоминантному эпитопу гемагглютинина; (iii) перекрестнореагирующими ЦТЛ к консервативным последовательностям внутренних белковых структур вириона [117, 173]. Однако следует помнить, что все эти факторы присутствовали и при формировании более интенсивного гуморального иммунного ответа к сезонным ЖГВ и ЖГВ А (H1N1) pdm 2009. Вряд ли низкий уровень репродукции птичьих вирусов, и, следовательно, гуморального иммунного ответа людей на испытанные ЖГВ связан с отличительной от человеческих вирусов гриппа А способностью птичьих вирусов соединяться исключительно с эпителиальными клетками через рецептор 2,3 Gal [113], присутствие которого в данных клетках верхних дыхательных путей у людей ограничено. Аргументом тому может служить тот факт, что человеческий вирус парагриппа, который связывается с такими же клетками через тот же рецептор 2,3 Gal, прекрасно размножается в верхних отделах дыхательного тракта, и гуморальный иммунный ответ к нему достаточно интенсивный [113]. Объясняют влияние на гуморальный иммунный ответ людей птичьих вирусов и особенностями его фенотипического рестриктирования, которое может возникать из-за констелляционных преобразований генома при реассортации птичьих и человеческих вирусов гриппа А [54]. Однако в литературе реальных подтверждений этому феномену мы не обнаружили.

Нам представляется, что ослабленный по интенсивности гуморальный иммунный ответ на ЖГВ, приготовленные из птичьих вирусов, связан не столько с их биологическими особенностями, сколько с фактом отсутствия у прививаемых лиц В-клеточной иммунологической памяти к данным возбудителям, поскольку эти люди контактировали с ними впервые. Такой же феномен наблюдался в 1977 году при рециркуляции вируса гриппа А (H1N1) после двадцатилетнего перерыва.

Так, в начале его пандемического цикла у молодых людей, впервые встретившихся с этим вирусом, постинфекционный и поствакцинальный антительный иммунный ответ был намного ниже, чем у более старших людей, которые перенесли грипп А (H1N1) в период его предшествующего пандемического цикла [12, 22]. Однако через 3 года после активной циркуляции вируса гриппа А (H1N1) этот феномен нивелировался. Другим важным аргументом может служить тот факт, что у не праймированных лиц 1969 г. рождения и младше гуморальный иммунный ответ на двукратную прививку ЖГВH2N2, приготовленную из циркулировавшего в 1957 – 1968 гг. пандемического вируса данного сероподтипа, был столь же низким по интенсивности, как и на ЖГВ, включавших птичьих вирусы [189]. И наконец, на ЖГВ А (H1N1) pdm 2009 этот тип иммунного ответа у волонтеров был намного выше, поскольку у них вирусспецифические Т- и В-клетки памяти к данному вирусу обнаруживались еще до вакцинации [5, 16]. По-видимому, эти клетки, сформированные в период предшествующих контактов организма с вирусами сероподтипа А (H1N1), и послужили причиной сравнительно низкой заболеваемости населения гриппом А (H1N1) pdm 2009.

Постоянный антигенный дрейф и неослабевающая угроза распространения новых пандемических вариантов вируса гриппа А привлекает особое внимание к проблеме формирования гетерологичного постинфекционного и поствакцинального иммунного ответа к разным штаммам и подтипам вируса гриппа А [22]. Основу данного процесса составляет способность тех или иных вирусов индуцировать продукцию перекрестнореагирующих антител, а также перекрестнореагирующих Т- и В-лимфоцитов. Накопление знаний по этому вопросу важно как с точки зрения понимания степени защищенности населения от новых антигенных вариантов возбудителя, так и с позиции обоснования использования в экстренных ситуациях уже имеющихся вакцин для защиты от новых вирусов.

У волонтеров, привитых ЖГВH5N2/индюк, проведен анализ гуморального иммунного ответа к вирусу гриппа А (H5N2)/утка (Табл. 4.2.1). Этим мы попытались ответить на вопрос, отличается ли иммунная система человека птичьих

вирусы одного подтипа, но выделенные в разное время от разных представителей? Кумулятивные данные о числе конверсий антител к обоим вирусам оказались близки по значению: к А (H5N2)/индюк и А (H5N2) /утка, соответственно, 79 и 72%. Это свидетельствует, что у обоих штаммов имеется значительный набор общих иммунодоминантных эпитопов, связанных с индукцией у прививаемых лиц перекрестнореагирующих антител. Возможно, что данный феномен относится ко всем ЖГВ, приготовленным из антропонозных и зоонозных вирусов гриппа А одного сероподтипа. Так, по нашим неопубликованным данным, у лиц, привитых сезонной тривалентной ЖГВ, количество конверсий сывороточных антител в РТГА к свиному вирусу гриппа А/Ontario/RV1273/2005(H3N2) существенно не отличалось от аналогичного показателя в отношении вакцинного человеческого вируса того же подтипа. Кроме того, у части обследованных добровольцев обнаруживались антитела к свиному вирусу в защитных титрах $\geq 1:40$ (Табл. 4.2.6). В этих условиях, несмотря на то, что свиной вирус гриппа А (SwH3N2) вызывал заболевания у людей [69], вряд ли он мог обладать какими-то эпидемическими, а тем более пандемическими потенциями.

Нами проверена способность испытуемых ЖГВH5N2 индуцировать конверсии перекрестнореагирующих антител к двум типам гетерологичных вирусов: с одинаковым с вакцинным штаммом гемагглютинином (H5N2) и с полным отличием в антигенной формуле по гемагглютину и нейраминидазе (H7N3) – Табл. 4.2.1. ЖГВH5N2 активно индуцировала продукцию перекрестнореагирующих сывороточных антител к потенциально пандемическому вирусу гриппа А (H5N1). В данном случае кумулятивный показатель числа их конверсий к вакцинному и гетерологичному вирусу составил, соответственно, 79 и 65%. При полном различии антигенной формулы вакцинного (H5N2) и гетерологичного вирусов (H7N3), кумулятивные показатели числа конверсий перекрестнореагирующих антител оказались значительно ниже – 24%. При этом наблюдали конверсии только сывороточных и локальных IgA-антител, но не сывороточных антигемагглютинирующих (РТГА) и вируснейтрализующих (РН) антител. Это объясняется, с одной стороны, штаммоспецифическими свойствами

РТГА и РМН, с другой – повышенной кроссреактивностью антител класса А [25]. В целом данные о частоте гетерологичных гуморальных и клеточных иммунных ответов на испытываемую вакцину свидетельствуют, что она вполне успешно может индуцировать иммунитет к потенциально пандемическому птичьему вирусу со сходным гемагглютинином, то есть к А (H5N1).

Помимо гуморального иммунного ответа нами проведено исследование индукции у тех же волонтеров Т-клеточной иммунологической памяти на вакцинацию ЖГВH5N2 – Таблица 4.2.6. Тестировали вирусспецифические Т-клетки фенотипов CD4+ и CD8+, а также относящихся к этим двум пулам центральные (T_{cm}) и эффекторные (T_{em}) клетки иммунологической памяти. Последние участвуют в формировании долговременной иммунологической памяти, но осуществляют это разными путями [121]. Ранее доказано два факта: первый – увеличение у людей уровня T_{cm} и T_{em} после заболевания гриппом А(H1N1) pdm 2009 [183], второй – наличие корреляции уровня этих клеток со снижением тяжести гриппозной инфекции, вызванной данным возбудителем [121]. Наши результаты показали, что ЖГВH5N2 индуцировала у 69% волонтеров конверсии изученных фенотипов Т-клеток, проявляющих специфичность к вакцинному штамму (Табл. 4.2.6). Обобщенные данные по поствакцинальному гуморальному и Т-клеточному ответу свидетельствуют о почти тотальном наличии у привитых (97%) того или иного типа адаптивной иммунной реакции к вакцинному штамму (Табл. 4.2.7).

Важно отметить, что полученные нами сведения по иммуногенности другой ЖГВH5N2, приготовленной и испытанной в Таиланде (Табл. 4.2.8 – 4.2.10), полностью подтвердили данные об особенностях развития гуморального иммунного ответа людей на отечественную ЖГВ А (H5N2), а именно: достаточный по частоте конверсий антител (около 50%), но слабый по интенсивности их продукции, то есть низкие значения СГТ и отсутствие лиц с протективными титрами в поставкцинальный период.

Обобщая приведенные в Главе 4.2 материалы, можно отметить следующее:

Практически все волонтеры (28 из 29) ответили на прививку отечественной ЖГВH5N2 тем или иным типом В- и/или Т-клеточных адаптивных иммунных реакций к вакцинному штамму А (H5N2). По данным РТГА, то есть регламентированного теста, доля таких реакций составила лишь 38%.

Отечественная ЖГВH5N2 индуцировала у 65% волонтеров гуморальный иммунный ответ в виде конверсий сывороточных и/или локальных антител к гетерологичному потенциально пандемическому вирусу гриппа птиц А (H5N1). Аналогичный показатель к вакцинному штамму был близок по значению – 79% конверсий. Однако к другому потенциально пандемическому птичьему вирусу гриппа А (H7N3) с полностью отличающейся антигенной формулой, показатель составил только 24% конверсий, причем эти конверсии касались только сывороточных и локальных IgA-антител (ИФА), но не сывороточных антигемагглютинирующих (РТГА) и вируснейтрализующих (РН) антител.

Отечественная ЖГВ А (H5N2) стимулировала у 69% волонтеров Т-клеточный иммунный ответ в виде конверсий Т-лимфоцитов иммунологической памяти к вакцинному штамму: CD4⁺, и/или CD8⁺, и/или CD4⁺Tcm, и/или CD4⁺Tem, и/или CD8⁺Tcm и/или CD8⁺Tem.

Повторная прививка волонтеров отечественной ЖГВH5N2 существенно увеличивала частоту (%) конверсий всех типов антител к вакцинному H5N2 и гетерологичному H5N1 вирусам гриппа А, а также Т-клеток иммунологической памяти, специфичных к вакцинному штамму.

Интенсивность гуморального иммунного ответа (СТГ) к вирусам H5N2 и H5N1 на двукратную прививку волонтеров ЖГВH5N2 оказалась значительно слабее по сравнению с аналогичными данными по сезонным вакцинам и вакцине А (H1N1) pdm 2009 в 2009 – 2010 гг.

Итак, в целом, гуморальный иммунный ответ людей на ЖГВH5N2 отличался высокой частотой конверсий антител, но слабой интенсивностью их продукции. Вакцина индуцировала и вирус-специфический Т-клеточный иммунный ответ в виде конверсии Т-лимфоцитов иммунологической памяти. Однако эти данные не

давали возможность предсказать поствакцинальное состояние иммунитета людей с точки зрения его воздействия на их реальную защиту от птичьих вирусов гриппа А. Поскольку противогриппозная иммунизация основана на успешности индукции долговременно функционирующей В- и Т-клеточной иммунологической памяти, возник вопрос, может ли ЖГВ А (H5N2) стимулировать у людей такую память к вирусу гриппа А (H5N1) в условиях высокого по частоте, но слабого по интенсивности поствакцинального иммунного ответа на эту вакцину. Поиск ответа на данный вопрос отражен в материалах **Главы 4.3**.

В качестве модели применяли «комбинационную вакцинацию» против потенциально пандемических вирусов гриппа А [125, 150, 209]. Конкретно, сравнивали иммунный ответ волонтеров к вирусам гриппа А (H5N1) и А (H5N2) на праймирование ЖГВH5N2 и отдаленное во времени (через 1,5 года) бустирование тех же лиц ИГВH5N1. Подразумевалось, что способность праймирующей ЖГВH5N2 формировать долговременную иммунологическую память к потенциально пандемическому вирусу гриппа А (H5N1) должна реализоваться в виде повышения количественных параметров иммунного ответа на буст-вакцину ИГВ А (H5N1). Контролем служили волонтеры, привитые ИГВH5N1, но не праймированные ЖГВH5N2.

В настоящей работе способность праймирующей ЖГВ H5N2 индуцировать иммунологическую память к бустирующей ИГВ H5N1 оценивали по пяти классическим характеристикам иммунологической памяти, а именно: скорость формирования – по состоянию иммунитета на раннем сроке (Д7) после прививки ИГВ H5N1; интенсивность ее формирования – по уровню иммунитета после первой (Д28) и второй (Д56) прививок; продолжительность сохранения – по состоянию иммунитета через 1,5 года после праймирования (Д0) и по количественным характеристикам иммунитета у праймированных волонтеров после вакцинации, по сравнению с не праймированными (Д28 и Д56); широта спектра антителообразования – по выявлению антител к гетерологичным вирусам; функциональная активность антител – по показателям авидности.

Обнаружено, что в предвакцинальный период (D0) у волонтеров, праймированных 1,5 года назад ЖГВ H5N2, ряд количественных параметров иммунитета к вирусам A(H5N1) и/или A(H5N2), оказались достоверно выше, чем у не праймированных лиц (Табл. 4.3.1, 4.3.3, 4.3.4). Кроме того, перед вакцинацией ИГВ H5N1 у первых СТГ сывороточных антител к консервативному участку гемагглютиниона (Stalk-домену) вакцинного вируса гриппа А (H5N1) был в 2,1 раза выше, чем у вторых – наши неопубликованные данные. Эти антитела участвуют в нейтрализации вируса гриппа [115]. Все это в совокупности косвенно свидетельствует, что праймирующая прививка ЖГВ H5N2 способствовала установлению долговременной В-клеточной памяти (не менее 1,5 года) не только к гомологичному вакцинному вирусу гриппа А (H5N2), но и к гетерологичному потенциально пандемическому вирусу гриппа А (H5N1) (Табл. 4.3.3). Обращает на себя внимание факт выявления перед вакцинацией (D0) у части не праймированных людей сывороточных IgA- и IgG-антител, а также цитотоксических Т-клеток иммунологической памяти, специфичных к вирусу гриппа А (H5N1). Учитывая, что эти люди не могли контактировать с птичьими вирусами, обнаруженные антитела и клетки можно отнести к перекрестнореагирующим, проявляющим комплементарность к общим для всех подтипов вируса гриппа А антигенным эпитопам. Уровень таких антител и Т-клеток поддерживается контактами (инфекция и вакцинация) с актуальными вирусами подтипов А(H1N1) и А(H3N2).

Установлено (Табл. 4.3.1, 4.3.2, 4.3.4), что у волонтеров, ранее праймированных ЖГВ H5N2, даже однократная прививка ИГВH5N1 оказывала хорошо выраженный бустлирующий эффект на развитие гуморального иммунного ответа к вакцинному штамму. Он проявлялся в ускоренной (D7) и усиленной (D28) продукции всех изученных типов антител. Повторная прививка ИГВ H5N1 оказывала либо слабый эффект, либо он вообще отсутствовал. Это свидетельствует о достаточности однократной вакцинации при использовании ИГВ H5N1 в качестве бустлирующего препарата. По данным американских авторов, праймирование взрослых людей ЖГВH5N1 также резко усиливало продукцию

антигемагглютинирующий (РТГА) и вируснейтрализующих (РМН) антител на отдаленную (через 5 лет) ревакцинацию ИГВ H5N1 [190].

При анализе результатов бустирования волонтеров к ИГВH5N1 на фоне предшествующего праймирования ЖГВH5N2 важно отметить, что ИГВH5N1 стимулировала не только продукцию сывороточных IgA- и IgG-антител, но и секрецию *in vitro* зрелыми В-клетками специфических к тому же вирусу РРАb аналогичных классов, особенно IgG-РРАb (Табл. 4.3.5). Сывороточные антитела и секретируемые *in vitro* В-клетками поликлональные антитела (РРАb) отличаются по качественному составу из-за разного происхождения и путей миграции секретирующих их зрелых В-клеток [62, 121]. По сравнению с сывороточными антителами, они обладают значительно большей штаммоспецифичностью [25, 46]. По нашим данным, поствакцинальный гуморальный иммунный ответ, фиксируемый в ИФА *in vivo* (сывороточные антитела) и *in vitro* (РРАb), отличался по ряду параметров (Табл. 4.3.3 и 4.3.5): во-первых, более низкий уровень IgA- и IgG-антител; во-вторых, смещение пика секреции IgA-антител на ранний срок после первой прививки (74% конверсий данных антител на 7 день), что позволило уже на этом этапе составить представление о высокой иммуногенности ИГВ А (H5N1) в части частоты антительных конверсий. Данные по последующим временным интервалам (D28 и D56), практически не дали дополнительной информации. Кроме того, использование теста позволило получить дополнительную информацию по иммуногенности ИГВH5N1 (Табл. 4.3.6).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности применения метода определения в ИФА секреции РРАb *in vitro* (надосадки культур МПК) в качестве альтернативного приема оценки иммуногенности гриппозных вакцин, дающего более точное и полное представление о гуморальном иммунном ответе непосредственно к штамму-индуктору антителогенеза. Ранее этот метод был применен при изучении поствакцинального иммунного ответа на прививку людей против столбняка [85], холеры [155], брюшного тифа [176] и при оценке иммуногенности сезонной коммерческой тривалентной ИГВ [46]. Американские авторы также отметили факт смещения пика поствакцинальной продукции РРАb

на ранний срок [46]. Вполне вероятно, что это объясняется двумя причинами: более ранним накоплением IgA-антител по сравнению с IgG-антителами [61], а также выявлением *in vitro* и *in vivo* двух разных пулов IgA-антител: в случае с сывороточными антителами – преимущественно кроссреактивных, а в системе *in vitro* – штаммоспецифичных.

Показано (Табл. 4.3.2), что бустлирующий эффект ИГВ H5N1 у праймированных ЖГВH5N2 волонтеров распространился не только на антителогенез к гомологичному вакцинному вирусу гриппа А (H5N1), но и ко всем гетерологичным вирусам с гемагглютинином H5. Полученные сведения о развитии кроссреактивного иммунного ответа расширяют тактические возможности применения комбинационных схем вакцинации против потенциально пандемических птичьих вирусов гриппа А. Ранее американскими учеными аналогичный кроссреактивный эффект был обнаружен у волонтеров в комбинационной системе: праймирующая адъювантная ИГВ H5N3 – бустлирующая субвирионная ИГВ H5N1 [92], а также в форме бустирования иммунного ответа к разным клэйдам вируса гриппа А H5N1 с помощью праймирования рекомбинантной вакциной с гемагглютинином H5 [124].

Главным в применении комбинационной стратегии вакцинации против потенциально пандемических вирусов гриппа А является вопрос об оценке способности праймирующей вакцины успешно индуцировать долговременную В-клеточную иммунологическую память. Если судить об успешности «закладки» в 2012 г. иммунологической памяти по количественным параметрам продукции антигемагглютинирующих (РТГА) или вируснейтрализующих (РМН) антител к праймирующему вирусу гриппа А(H5N2), то можно прийти к неправильному выводу о слабости развития этого процесса (Табл. 4.3.1, 4.3.2, 4.3.4). Однако мощный бустлирующий эффект, зафиксированный в 2014 г даже у лиц с отсутствием конверсий антител на праймирование (Табл. 4.3.7), полностью опровергает этот вывод. На самом деле, формирование В-клеточной памяти на праймирование ЖГВ H5N2 было вполне успешным, поскольку по совокупным данным всех иммунологических тестов (РТГА, РМН, ИФА – сывороточные и

локальные IgA-антитела, вируснейтрализующие Т-клетки памяти) 18 из 19 волонтеров (95%) ответили на ЖГВ тем или иным типом иммунной реакции. Это свидетельствует, что по отдельности РТГА (официально регламентированный тест для оценки иммуногенности гриппозных вакцин) и РМН (наиболее распространенный не регламентированный тест) не отражают истинную картину формирования у людей В-клеточной иммунологической памяти – одного из важнейших звеньев адаптивного иммунитета. Для этого необходимо ориентироваться на совокупные данные об иммунных ответах на ЖГВ, полученные при анализе разных факторов иммунной защиты: сывороточных и локальных антител, цитотоксических и хелперных Т-клеток иммунологической памяти. Такой подход успешно применен нами позднее при оценке иммуногенности отечественной ЖГВ против других потенциально пандемических вирусов гриппа А: H7N9 [163, 164] и H7N3 [162]

Авидность антител отражает созревание В-клеточной иммунологической памяти к инфекционным агентам [25]. Ранее зарубежными авторами учеными было показано, что праймирование людей ЖГВ H5N1 приводит к усилению продукции высокоавидных сывороточных антител к вакцинному штамму бустирующей ИГВ H5N1 [195]. По нашим данным, иммунизация людей сезонными ЖГВ, и ЖГВ A pdm 2009 (H1N1) также повышала авидность локальных IgA-антител [4, 8]. Результаты настоящего исследования (Табл. 4.3.8) свидетельствует, что праймирование ЖГВ H5N2 приводило к повышению авидности сывороточных IgA- и IgG-антител к вакцинному штамму ИГВH5N1. Это подтверждает данные о более низкой способности инактивированных гриппозных вакцин, по сравнению с живыми вакцинами, индуцировать высокоавидные сывороточные антитела [19, 22].

Анализ развития Т-клеточного иммунного ответа на ИГВH5N1 у праймированных и не праймированных ЖГВ H5N2 волонтеров показал парадоксальный эффект (Табл. 4.3.9). По аналогии с гуморальным иммунным ответом, мы ожидали, что поствакцинальная продукция вирусспецифических CD8+ Т-клеток иммунологической памяти у праймированных будет выше, чем у

не праймированных. Однако этого не наблюдалось. Можно предположить, что торможение CD8⁺ Т-клеточного иммунного ответа у праймированных волонтеров носит либо компенсаторный характер вследствие резко усиленного гуморального иммунного ответа, либо оно связано с более высоким исходным уровнем этих клеток у праймированных лиц в Д0 (Табл. 4.3.9). Статистический анализ полученных результатов показал высокие значения коэффициента Спирмена, отражающие существование четко выраженной обратной зависимости между уровнями CD8⁺, CD8⁺Tcm и CD8⁺Tem Т-клеток перед вакцинацией и достоверным (в 20 и более раз) конверсиями этих клеток после прививки ИГВН5N1 (Табл. 4.3.10).

В работе американских авторов [131] совершенно справедливо поставлен вопрос о выборе оптимальных сроков между введением праймирующих и бустерирующих вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа А. Это важно с точки зрения развития полноценной поствакцинальной иммунологической памяти на праймирование. Показано, что короткий период (1 – 3 месяца) между праймирующей и бустерирующей прививками ИГВ вызывал обратный эффект – снижения интенсивности гуморального иммунного ответа на последнюю [64]. В исследовании по праймированию людей ЖГВ Н5N1 с последующим через 5 лет бустированием ИГВ Н5N1 приведены убедительные доказательства сохранения поствакцинальной В-клеточной иммунологической памяти к праймирующему вирусу [190]. Эти данные свидетельствуют, что в стратегическом плане даже очень длительный интервал между праймированием и бустированием вряд ли может отразиться на защитной функции приобретенной В-клеточной памяти. Однако вопрос о сроках существенен с точки зрения тактики вакцинации. Проводить массовую вакцинацию людей против потенциально пандемических вирусов гриппа А без возникновения угрожающей ситуации с экономической точки зрения нерентабельно. Обычно между возникновением такой ситуации и полноценным развитием пандемии нового серотипа вируса гриппа А проходит не менее 1-1,5 лет. За этот период времени можно успеть праймировать население ЖГВ в ближайший сезон вакцинации (сентябрь – ноябрь), а на следующий сезон

бустировать ИГВ. Поэтому мы считаем выбранный нами период в 1,5 года оптимальным.

Обобщая данные главы 4.3, можно отметить следующее:

Двукратная прививка ИГВ H5N1 не праймированных лиц слабо стимулировала гуморальный иммунный ответ к вакцинному штамму. Отдаленное (1,5 года назад) праймирование людей ЖГВ H5N2 резко ускорило и усиливало продукцию сывороточных антител даже после однократной вакцинации ИГВ H5N1. Это касалось антител как к вакцинному вирусу гриппа А H5N1, так и к гетерологичным штаммам с тем же гемагглютинином. Праймирование ЖГВ А (H5N2) ускорило и усиливало накопление не только сывороточных, но и секретируемых *in vitro* IgA- и IgG- PPAб к вакцинному штамму А (H5N1). В большей степени это касалось IgG- PPAб. По сравнению с сывороточными IgA- антителами, пик накопления секретируемых *in vitro* IgA- PPAб наблюдался на раннем сроке (7 день) после первичной вакцинации ИГВH5N1. В этот период отмечено значительное количество поствакцинальных конверсий IgA PPAб (74%).

У праймированных лиц IgA- и IgG-антитела к вакцинному штамму обладали более высокой авидностью по сравнению с не праймированными.

Все перечисленные выше факты свидетельствуют о том, что отдаленное праймирование людей отечественной ЖГВ H5N2 формирует долговременную В-клеточную иммунологическую память к потенциально пандемическому вирусу гриппа А (H5N1). В отдельности данные РТГА и РМН об иммуногенности праймирующей ЖГВ H5N2 не отражали ее истинные свойства по «закладке» В-клеточной памяти. Для правильной оценки этого качества ЖГВ требуется учет совокупных данных комплексного иммунологического обследования прививаемых людей (РТГА+РМН+ИФА+Т-клетки памяти). Оптимальным сроком между праймированием ЖГВ и бустированием ИГВ является 15-18 месяцев. В целом, полученные данные обосновывают новое направление в применении ЖГВ для защиты от потенциально пандемических вирусов гриппа А.

В Главе 4.1 были представлены данные об особенностях развития у людей разного возраста постинфекционного гетеросубтипического иммунного ответа к

потенциально пандемическому антропонозному вирусу гриппа А (H2N2). Однако в рамках настоящей работы нам не удалось изучить поствакцинальный иммунный ответ людей к новому возбудителю из-за существующих строгих ограничений на введение людям живых вирусов гриппа А (H2N2). Поэтому поствакцинальный иммунный ответ к нему был исследован в эксперименте на мышах (**глава 4.4**). Сравнивали системный гуморальный (сывороточные антитела в РТГА), локальный гуморальный (IgA-антитела СВДП) и системный и локальный Т-клеточный (вирусспецифические CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты соответственно в селезенке и НАЛТ) иммунные ответы животных на 15 штаммов А (H2N2). Они включили: «дикий» вирус (эталонный штамм) и 14 его генно-инженерных модификаций с одиночными и комплексными мутациями, привнесенный обратной генетикой от донора аттенуации Ф/Ленинград/134/57 (H2N2). Мутации касались генов PB1, PB2, PA, NP, M1 и NS2 (Табл. 4.4.1). Перечисленные штаммы отличались по патогенности (активности репродукции вируса в легких: Ig EID50 1,2 – 5,7).

Использованный дизайн опыта позволил получить ответы на следующие не изученные вопросы:

1. Каковы количественные и качественные характеристики иммунного ответа к «дикому» (эталонному) вирусу гриппа А (H2N2)?
2. Имеются ли отличия в индукции различных звеньев адаптивного иммунитета между «диким» вирусом гриппа А (H2N2) и прототипом вакцинного штамма для ЖГВ, то есть штаммом, содержащим полный набор мутаций, характерных для донора аттенуации А/Ленинград/17/134/57 (H2N2)?
3. Изменяются ли количественные и качественные характеристики адаптивного иммунного ответа при внесении отдельных или комплексных мутаций в геном «дикого» вируса гриппа А (H2N2) (гены PB1, PB2, PA, NP, M1 и NS2)?
4. Существуют ли мутации, которые можно использовать в обратной генетике или генетической реассортации для повышения иммуногенности вакцинного штамма для ЖГВ А H2N2?

В этой последовательности и проведено обсуждение полученных материалов.

Вопросы 1 и 2. Установлено, что «дикий» вирус индуцировал хорошо выраженный первичный и вторичный В- и Т-клеточный иммунный ответ, отражаемый сывороточными антителами, локальными IgA – антителами, системными (в селезенке) и локальными (в НАЛТ) вирусспецифическими CD4+ и CD8+ Т-клетками (Рис. 4.4.1 – 4.4.4). Обратногогенетический аналог вакцинного штамма с полным набором мутаций от донора аттенуации (2) уступал «дикому» вирусу в стимуляции всех изученных факторов иммунной защиты (Рис. 4.4.1 – 4.4.4).

Ранее факт снижения иммуногенных свойств реассортантного вакцинного вируса (генетическая формула 6/2) отмечен в иной модели экспериментального опыта: сравнение антительного и Т-клеточного иммунного ответа на высокопатогенный для мышей вирус А/PR/8/34 (H1N1) и аттенуированный реассортантный аналог вакцинного штамма, включающий поверхностные белки от первого вируса, а все остальные – от донора аттенуации [5, 23, 154]. Безусловно, что такое снижение иммуногенных свойств связано только с перенесением в вакцинный штамм внутренних белков от донора аттенуации, поскольку в нашем опыте внешние белки были приобретены от «дикого» вируса гриппа А(H2N2), а в цитированных исследованиях – от патогенного для мышей модельного вируса гриппа А/PR/8/34(H1N1).

Вопрос 3. В целом, полученные данные (Рис. 4.4.1 – 4.4.4) свидетельствуют о наличии значительных колебаний в индукции разными мутантными штаммами А(H2N2) изученных типов иммунного ответа. По способности стимулировать выработку сывороточных и локальных мутантные штаммы можно разделить на две группы: с равной или превышающей иммуногенностью по отношению к эталонному «дикому» вирусу гриппа А (H2N2) и с более низкими показателями (табл. 4.4.2). Если оценивать иммунный ответ по его отдельным составляющим (сывороточные антитела, локальные антитела, вирус-специфические Т-клетки селезенки и НАЛТ), то он характеризовался значительным полиморфизмом, то есть

одни и те же мутации могли сочетаться как с усилением, так и со снижением тех или иных факторов адаптивного иммунитета по отношению к эталонному «дикому» штамму A(H2N2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что перенесение по отдельности или в сочетаниях в «дикий» вирус гриппа A(H2N2) различных мутаций, присутствующих в доноре аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), влияет разнонаправленно на количественные и качественные характеристики иммуногенности мутантных штаммов. К такому же выводу мы пришли в предшествовавшей экспериментальной работе по изучению иммуногенности мутантных штаммов высокопатогенного для мышей вируса A/PR/8/34 (H1N1) [10].

Нами не установлено существование четкой связи между активностью размножения мутантных вирусов гриппа A(H2N2) в легких и выраженностью антительного и Т-клеточного иммунного ответа. Так, показатели интенсивности накопления сывороточных антител, локальных антител и CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток после введения аттенуированных штаммов и более патогенных штаммов существенно не отличались (Рис. 4.4.1 – 4.4.4). Аналогичный феномен был отмечен нами и в отношении мутантных вирусов A/PR/8/34 (H1N1) [10].

Вопрос 4. В инфекционной иммунологии важным и перспективным направлением является изучение зависимости формирования постинфекционного и поствакцинального иммунитета от генотипических особенностей возбудителя и хозяина (молекулярно-генетическая иммунология). Применительно к противогриппозной вакцинации наибольшую актуальность приобретает исследование вопроса о связи естественных и искусственно приобретенных мутаций в генах вакцинных штаммов с количественными и качественными характеристиками поствакцинального адаптивного иммунитета [1]. При конструировании новых ЖГВ важно добиться оптимального соотношения между аттенуацией и иммуногенностью вакцинного штамма. Широкие перспективы для этого открывает метод приготовления вакцинных штаммов обратной генетикой, когда в него можно переносить «полезные» мутации, обеспечивающие достаточную аттенуацию в сочетании с высокой иммуногенностью.

Нами показано (Табл. 4.4.2), что штамм с одиночной мутацией в М1 (I15V) не уступал «дикому» эталонному вирусу в интенсивности индукции всех изученных параметров иммунного ответа. При этом он обладал достаточной аттенуацией по показателю репродукции в легких. Другой аттенуированный вирус с мутациями в генах PB2 (V478L), PB1 (K265N), NS2 (M100I) не хуже, чем «дикий» вирус индуцировал все типы антител и CD8⁺ Т-клетки, а аттенуированный штамм с мутациями в полимеразных генах PB1 и PB2 – сывороточные и локальные антитела. По нашим данным, аттенуированные вирусы A/PR/8/34 (H1N1) с мутациями в генах полимеразного комплекса активно стимулировали у мышей продукцию сывороточных антител (РТГА), сывороточных IgA- и IgG-антител (ИФА), а также CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток [10].

Таким образом, в настоящей работе в рамках экспериментального опыта *in vivo* обозначены наиболее перспективные мутации, способные активно индуцировать Т- и В-клеточный иммунный ответ при сохранении аттенуирующих свойств штаммов. Эти мутации входят в состав мутационного комплекса, приобретаемого вакцинным штаммом от донора аттенуации. Вполне вероятно, что количество таких мутаций, возникающих в процессе антигенного дрейфа внутренних генов вируса гриппа А может быть и больше [. Для этого необходимо расширить их поиск *in vivo* и *in silico*.

Нами показано, что повторное введение всех 14 изученных штаммов увеличивало показатели накопления сывороточных антител (Рис. 4.2.4) и локальных IgA-антител (Рис. 4.4.2, 4.4.2). Это свидетельствует о желательности двойной вакцинации против вируса гриппа А (H2N2). Однако имелось одно исключение – падение уровня локальных IgA-антител после второй инокуляции штаммов N 13 – 15 с комбинированными мутациями (Рис. 4.4.2). В этом случае скорее всего супрессия вторичного иммунного ответа связана с тем, что он развивался на фоне очень высоких значениях СГТ локальных IgA-антител, достигнутых после первой иммунизации. Ранее нами показано влияние исходных титров этих антител на выраженность поствакцинального локального иммунного ответа к вирусам гриппа А (H1N1) и А (H3N2) [5].

Таким образом, полученные в главе 4.4 данные позволяют сделать следующие выводы:

Заражение мышей «диким» вирусом гриппа А(Н2N2) активно стимулирует первичный и вторичный иммунный ответ, реализующийся в накоплении сывороточных антител, локальных IgA-антител, вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в селезенке и входных воротах гриппозной инфекции (НАЛТ).

Обратногенетический аналог вакцинного штамма А (Н2N2) с полным набором мутаций от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (Н2N2) существенно уступает «дикому» вирусу А (Н2N2) в стимуляции локального гуморального и вирусспецифического Т-клеточного иммунитета.

Внесение в гены PB1, PB2, PA, NP, M1 и NS2 «дикого» вируса гриппа А(Н2N2) тех или иных одиночных или комплексных мутаций, характерных для донора аттенуации, может изменять количественные параметры гуморального и Т-клеточного иммунного ответа. Эти изменения носят разнонаправленный характер, то есть способны понижать или усиливать интенсивность стимуляции данных факторов иммунной защиты.

Необходим поиск мутаций во внутренних генах вируса гриппа А, обеспечивающих высокую иммуногенность вакцинного штамма в сочетании с его достаточной аттенуацией. В этом направлении получены обнадеживающие результаты со штаммами А (Н2N2), содержащими одиночную мутацию в гене M1 (I144L) и комбинированные мутации в генах PB2 (V468L, K265N) и NS2 (M100I).

В целом, проведенные исследования хорошо вписываются в новое бурно развивающееся направление вирусологической иммунологии – молекулярно-генетическая иммунология вирусов.

Список сокращений

АТ – антитела;

ВОЦ – внутриклеточное окрашивание цитокинов;

ЖГВ – живая гриппозная вакцина;

ИГВ – инактивированная гриппозная вакцина;

ИФА – иммуноферментный анализ;

МПК – мононуклеары периферической крови;

НАЛТ – назоассоциированная лимфоидная ткань;

ПЦ – проточная цитометрия;

РТГА – реакция торможения гемагглютинации;

РМН – реакция микронейтрализации;

СВДП – секреты верхних дыхательных путей;

СГТ – Средние геометрические титры антител

СК – сыворотка крови;

СО – стандартное отклонение

EID50 – эмбриональная инфекционная доза 50

НА – Гемагглютинин

IFN γ – интерферон γ

MOI – multiplicity of infection

NA – Нейраминидаза

PPAb – Plasmablast-derived polyclonal antibody – антитела, секретируемые in vitro (надосадки культур МПК) зрелыми плазмобластными В-лимфоцитами

Tcm – вирусспецифические Т-клетки центральной памяти

Tem – вирусспецифические Т-клетки эффекторной памяти

Список литературы

1. *Программа фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013-2020 года (Распоряжение Правительства Российской Федерации от 3 декабря 2012 N2237-р), подраздел 205 «Получение новых знаний о механизмах постинфекционной и поствакцинальной иммунологии».*
2. *Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. Методические указания МУ 3.3.2.1758-03. от 28.09.2003, утв. Главным государственным санитарным врачом РФ.*
3. Баранцева И.Б., Найхин А.Н., Дониная С.А., Степанова Л.А., Рекстин А.Р., Григорьева Е.П., Дешева Ю.А. Руденко Л.Г. *Гуморальный и местный иммунный ответ на гриппозные вакцины у лиц пожилого и молодого возраста. Вопросы вирусологии. 2003;т48:32 - 36.*
4. Дониная С.А., Кореньков Д.А., Руденко Л.Г. Найхин А.Н. *Оценка avidности локальных IgA-антител у людей, привитых живой гриппозной вакциной. Медицинская иммунология. 2008;т.10(№ 4-5):423-430.*
5. Дониная 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, № 3:37-42. .*

6. Карпухин Г.И. *Антигенный анахронизм вирусов гриппа А (H2N2) в Ленинграде в 1980г.* Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 1984:105-110.
7. Кильбурн Э.Д. *Вирусы гриппа и грипп.* Издательство МЕДИЦИНА. 1977:309 с.
8. Киселев О. И., Ершов Ф. И., Быков А. Т.Покровский В. И. *Пандемия гриппа 2009/2010: противовирусная терапия и тактика лечения.* Санкт–Петербург–Москва–Сочи ООО «А–Принт». 2010:98.
9. Кореньков Д.А., Исакова-Сивак И.Н., Кузнецова В.А., Лосев И.В., Руденко Л.Г.Найхин А.Н. *Сравнительный иммуноэпитопный анализ нуклеопротеинов современных циркулирующих вирусов гриппа А и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) для живой гриппозной вакцины.* MEDICAL SCIENCES. 2014;№10:908 - 912.
10. Кузнецова С.А., Исакова-Сивак И.Н., Кузнецова В.А., Петухова Г.Д., Лосев И.В., Доница С.А., Руденко Л.Г.Найхин А.Н. *Влияние точечных мутаций в генах полимеразного комплекса вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) на иммунный ответ мышей.* Вопросы вирусологии. 2015;60(№2):25-30.
11. Найхин А.Н., Артемьева С.А., Ермаченко Т.А., Выборных Е.Н., Кустикова Ю.Г., Дорошенко Е.В., Каторгина Л.Г., Денисов Г.М.Ким Т.Н. *Функциональная активность антител при иммунизации гриппозными вакцинами.* Вопросы вирусологии. 1993;№ 5:204-207.

12. Найхин А.Н., Баранцева И.Б., Рекстин А.Р., Дониная С.А., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. *Возрастные особенности формирования иммунного ответа людей на живую и инактивированную гриппозные вакцины.* Биопрепараты: Профилактика, диагностика, лечение. 2004; Сентябрь 2004:22-27.
13. Найхин А.Н., Дониная С.А., Кустикова Ю.Г., Каторгина Л.Г., Ким Т.Н., Руденко Л.Г. *Изучение в иммуноферментном анализе поствакцинального секреторного иммунитета к вирусам гриппа А и В с помощью разработанной моноклональной иммуноферментной тест-системы.* Вопросы вирусологии. 1977; № 6:271-275.
14. Найхин А.Н., Дониная С.А., Кустикова Ю.Г., Каторгина Л.Г., Руденко Л.Г. *Моноклональная иммуноферментная тест-система для оценки секреторного иммунитета к вирусам гриппа А и В* Вопросы вирусологии. 1997; №5:212-215.
15. Найхин А.Н., Дониная С.А., Лосев И.В., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Стукова М.А., Ерофеева М.К., Коншина О.С., Смолоногина Т.А., Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. *Гомологичный и гетерологичный гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ людей на живые реассортантные гриппозные вакцины А(Н5N2) и А(Н7N3).* Медицинская иммунология. 2015; Т. 17(№ 1):59-70.
16. Найхин А.Н., Дониная С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П., Суворова М.А., Руденко Л.Г. *Гуморальный и клеточный иммунный ответ у людей к вирусу гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1) - А(H1N1)pdm2009.* Вопросы Вирусологии. 2013; 58(№2):38-42.

17. Найхин А.Н.Лосев И.В. *Роль консервативных и гипервариабельных иммунодоминантных эпитопов внутренних белков вирусов гриппа А в формировании цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа.* Вопросы Вирусологии. 2015;60(№ 1):11-16.
18. Найхин А.Н., Топурия Н.В.А.Т. И. *Комплекс изучения популяционного иммунитета к трем антигенам вируса гриппа А.* Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 1981;№2:77-81.
19. Найхин А.Н. А.С.А., Босак Л.В., Каторгина Л.Г. . *Значение функциональной активности антител в противогриппозном иммунитете.* Вестник РАМН. 1995;№ 9.:С. 32 - 36.
20. Найхин А.Н. В.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):194-197.
21. Найхин А.Н. Д.Г.М., Исмагулов А.Т. И Др. . *Характеристика состояния популяционного иммунитета в эпидемию гриппа 1977-78 гг.* Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 1980;№ 6:92-95.
22. Найхина.Н. *Гетеросубтипический иммунитет к вирусам гриппа А: эпидемиологические данные, вовлеченность разных иммунологических факторов, вакцинация* Вопросы Вирусологии. 2012;№3:4-9.

23. Петухова Г.Д., Найхин А.Н.Баранцева И.Б. *Локальный гуморальный и клеточный иммунный ответ мышей при гриппозной инфекции и вакцинации.* Медицинская иммунология. 2006;8(N 4):511-516.
24. Руденко Л.Г., Киселева И.В., Ларионова Н.В., Bosch J.F., Cruijisen S.K., Drieszen-Heldens J.G., Teley L.C.Voeten J.T. *Ведущая роль генов полимеразного комплекса в аттенуации доноров отечественной живой гриппозной вакцины А и В.* Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2010;N 6:41-47.
25. Ярилин А.А. *Иммунология : учебник.* Гэотар Медиа. 2010:749 с.
26. *WHO global influenza preparedness plan.* 2005.
27. *WHO Global pandemic influenza action plan to increase vaccine supply.* 2006.
28. *WHO case definitions for human infections with influenza A(H5N1) virus.* 2006.
29. *WHO guidelines for investigation of human cases of avian influenza A(H5N1).* 2007.
30. *Avian influenza - Situation in Pakistan - Update.* 2007.
31. *Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases.* 2007.

32. *Fourth meeting of National Influenza Centres in the WHO Western Pacific Region - May 2010.* Wkly Epidemiol Rec. 2010;85(46):457-60.
33. *Human cases of influenza at the human-animal interface, 2013.* Wkly Epidemiol Rec. 2014;89(28):309-20.
34. *Human cases of influenza at the human-animal interface, January 2014-April 2015.* Wkly Epidemiol Rec. 2015;90(28):349-62.
35. *Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO.* 2017.
36. . WHO global influenza preparedness plan, 2005.
37. Abdel-Ghafar A.N., Chotpitayasunondh T., Gao Z., Hayden F.G., Nguyen D.H., De Jong M.D., Naghdaliyev A., Peiris J.S., Shindo N., Soeroso S., Uyeki T.M. Writing Committee of the Second World Health Organization Consultation on Clinical Aspects of Human Infection with Avian Influenza A.V. *Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans.* N Engl J Med. 2008;358(3):261-73.
38. Adalja A.A.Henderson D.A. *Original antigenic sin and pandemic (H1N1) 2009.* Emerg Infect Dis. 2010;16(6):1028-9.
39. Akondy R.S., Monson N.D., Miller J.D., Edupuganti S., Teuwen D., Wu H., Quyyumi F., Garg S., Altman J.D., Del Rio C., Keyserling H.L., Ploss A., Rice C.M., Orenstein W.A.,

Mulligan M.J.Ahmed R. *The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response*. J Immunol. 2009;183(12):7919-30.

40. Alexander D.J. *Avian Influenza: Historical Aspects*. Avian Diseases. 2003;Vol. 47:pp. 4-13.

41. Amonsin A., Songserm T., Chutinimitkul S., Jam-On R., Sae-Heng N., Pariyothorn N., Payungporn S., Theamboonlers A.Poovorawan Y. *Genetic analysis of influenza A virus (H5N1) derived from domestic cat and dog in Thailand*. Arch Virol. 2007;152(10):1925-33.

42. Antrobus R.D., Lillie P.J., Berthoud T.K., Spencer A.J., McLaren J.E., Ladell K., Lambe T., Milicic A., Price D.A., Hill A.V.Gilbert S.C. *A T cell-inducing influenza vaccine for the elderly: safety and immunogenicity of MVA-NP+M1 in adults aged over 50 years*. PLoS One. 2012;7(10):e48322.

43. Apisarnthanarak A., Erb S., Stephenson I., Katz J.M., Chittaganpitch M., Sangkitporn S., Kitphati R., Thawatsupha P., Waicharoen S., Pinitchai U., Apisarnthanarak P., Fraser V.J.Mundy L.M. *Seroprevalence of anti-H5 antibody among Thai health care workers after exposure to avian influenza (H5N1) in a tertiary care center*. Clin Infect Dis. 2005;40(2):e16-8.

44. Arafa A.S., Naguib M.M., Luttermann C., Selim A.A., Kilany W.H., Hagag N., Samy A., Abdelhalim A., Hassan M.K., Abdelwhab E.M., Makonnen Y., Dauphin G., Lubroth J., Mettenleiter T.C., Beer M., Grund C.Harder T.C. *Emergence of a novel cluster of influenza*

A(H5N1) virus clade 2.2.1.2 with putative human health impact in Egypt, 2014/15. Euro Surveill. 2015;20(13):2-8.

45. Baz M., Luke C.J., Cheng X., Jin H., Subbarao K. *H5N1 vaccines in humans.* Virus Res. 2013;178(1):78-98.

46. Belshe R., Lee M.S., Walker R.E., Stoddard J., Mendelman P.M. *Safety, immunogenicity and efficacy of intranasal, live attenuated influenza vaccine.* Expert Rev Vaccines. 2004;3(6):643-54.

47. 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;46(1):1-8.

48. Bonduelle O., Carrat F., Luyt C.E., Leport C., Mosnier A., Benhabiles N., Krivine A., Rozenberg F., Yahia N., Samri A., Rousset D., Van Der Werf S., Autran B., Combadiere B. *Characterization of pandemic influenza immune memory signature after vaccination or infection.* J Clin Invest. 2014;124(7):3129-36.

49. Boon A.C., De Mutsert G., Graus Y.M., Fouchier R.A., Sintnicolaas K., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. *Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes.* J Virol. 2002;76(5):2567-72.

50. Bridges C.B., Lim W., Hu-Primmer J., Sims L., Fukuda K., Mak K.H., Rowe T., Thompson W.W., Conn L., Lu X., Cox N.J., Katz J.M. *Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998*. J Infect Dis. 2002;185(8):1005-10.
51. Buchy P., Mardy S., Vong S., Toyoda T., Aubin J.T., Miller M., Touch S., Sovann L., Dufourcq J.B., Richner B., Tu P.V., Tien N.T., Lim W., Peiris J.S., Van Der Werf S. *Influenza A/H5N1 virus infection in humans in Cambodia*. J Clin Virol. 2007;39(3):164-8.
52. Bui C., Bethmont A., Chughtai A.A., Gardner L., Sarkar S., Hassan S., Seale H., Macintyre C.R. *A Systematic Review of the Comparative Epidemiology of Avian and Human Influenza A H5N1 and H7N9 - Lessons and Unanswered Questions*. Transbound Emerg Dis. 2016;63(6):602-620.
53. Castellino F., Galli G., Del Giudice G., Rappuoli R. *Generating memory with vaccination*. Eur J Immunol. 2009;39(8):2100-5.
54. Cauldwell A.V., Moncorge O., Barclay W.S. *Unstable polymerase-nucleoprotein interaction is not responsible for avian influenza virus polymerase restriction in human cells*. J Virol. 2013;87(2):1278-84.
55. Centers for Disease C.Prevention. *Swine-origin influenza A (H3N2) virus infection in two children--Indiana and Pennsylvania, July-August 2011*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2011;60(35):1213-5.
56. Chan P.K. *Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997*. Clin Infect Dis. 2002;34 Suppl 2:S58-64.

57. Chang H., Huang C., Wu J., Fang F., Zhang W., Wang F., Chen Z. *A single dose of DNA vaccine based on conserved H5N1 subtype proteins provides protection against lethal H5N1 challenge in mice pre-exposed to H1N1 influenza virus.* Virol J. 2010;7:197.
58. Chen G.L., Lamirande E.W., Jin H., Kemble G., Subbarao K. *Safety, immunogenicity, and efficacy of a cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) vaccine in mice and ferrets.* Virology. 2010;398(1):109-14.
59. Chen Y., Deng W., Jia C., Dai X., Zhu H., Kong Q., Huang L., Liu Y., Ma C., Li J., Xiao C., Liu Y., Wei Q., Qin C. *Pathological lesions and viral localization of influenza A (H5N1) virus in experimentally infected Chinese rhesus macaques: implications for pathogenesis and viral transmission.* Arch Virol. 2009;154(2):227-33.
60. Chen Y., Qin K., Wu W.L., Li G., Zhang J., Du H., Ng M.H., Shih J.W., Peiris J.S., Guan Y., Chen H., Xia N. *Broad cross-protection against H5N1 avian influenza virus infection by means of monoclonal antibodies that map to conserved viral epitopes.* J Infect Dis. 2009;199(1):49-58.
61. Chirkova T., Petukhova G., Korenkov D., Naikhin A., Rudenko L. *Immunization with live influenza viruses in an experimental model of allergic bronchial asthma: infection and vaccination.* Influenza Other Respir Viruses. 2008;2(5):165-74.
62. Chirkova T.V., Naikhin A.N., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Donina S.A., Mironov A.N., Rudenko L.G. *Memory T-cell immune response in healthy young adults vaccinated*

with live attenuated influenza A (H5N2) vaccine. Clin Vaccine Immunol. 2011;18(10):1710-8.

63. Choi Y.K., Nguyen T.D., Ozaki H., Webby R.J., Puthavathana P., Buranathal C., Chaisingh A., Auewarakul P., Hanh N.T., Ma S.K., Hui P.Y., Guan Y., Peiris J.S., Webster R.G. *Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004.* J Virol. 2005;79(16):10821-5.

64. Choi Y.S., Baek Y.H., Kang W., Nam S.J., Lee J., You S., Chang D.Y., Youn J.C., Choi Y.K., Shin E.C. *Reduced antibody responses to the pandemic (H1N1) 2009 vaccine after recent seasonal influenza vaccination.* Clin Vaccine Immunol. 2011;18(9):1519-23.

65. Chotpitayasunondh T., Ungchusak K., Hanshaoworakul W., Chunsuthiwat S., Sawanpanyalert P., Kijphati R., Lochindarat S., Srisan P., Suwan P., Osotthanakorn Y., Anantasetagoon T., Kanjanawasri S., Tanupattarachai S., Weerakul J., Chaiwirattana R., Maneerattanaporn M., Poolsavathitikool R., Chokephaibulkit K., Apisarnthanarak A., Dowell S.F. *Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004.* Emerg Infect Dis. 2005;11(2):201-9.

66. Clementi N., De Marco D., Mancini N., Solforosi L., Moreno G.J., Gubareva L.V., Mishin V., Di Pietro A., Vicenzi E., Siccardi A.G., Clementi M., Burioni R. *A human monoclonal antibody with neutralizing activity against highly divergent influenza subtypes.* PLoS One. 2011;6(12):e28001.

67. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B.M., Agatic G., Bianchi

S., Giacchetto-Sasselli I., Calder L., Sallusto F., Collins P., Haire L.F., Temperton N., Langedijk J.P., Skehel J.J., Lanzavecchia A. *A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins*. *Science*. 2011;333(6044):850-6.

68. Cowling B.J., Jin L., Lau E.H., Liao Q., Wu P., Jiang H., Tsang T.K., Zheng J., Fang V.J., Chang Z., Ni M.Y., Zhang Q., Ip D.K., Yu J., Li Y., Wang L., Tu W., Meng L., Wu J.T., Luo H., Li Q., Shu Y., Li Z., Feng Z., Yang W., Wang Y., Leung G.M., Yu H. *Comparative epidemiology of human infections with avian influenza A H7N9 and H5N1 viruses in China: a population-based study of laboratory-confirmed cases*. *Lancet*. 2013;382(9887):129-37.

69. Cox C.M., Neises D., Garten R.J., Bryant B., Hesse R.A., Anderson G.A., Trevino-Garrison I., Shu B., Lindstrom S., Klimov A.I., Finelli L. *Swine influenza virus A (H3N2) infection in human, Kansas, USA, 2009*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(6):1143-4.

70. 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;12(11):993-9.

71. Dalziel A.E., Delean S., Heinrich S., Cassey P. *Persistence of Low Pathogenic Influenza A Virus in Water: A Systematic Review and Quantitative Meta-Analysis*. *PLoS One*. 2016;11(10):e0161929.

72. De Jong M.D., Hien T.T. *Avian influenza A (H5N1)*. *J Clin Virol*. 2006;35(1):2-13.

73. De Jong M.D., Simmons C.P., Thanh T.T., Hien V.M., Smith G.J., Chau T.N., Hoang D.M., Chau N.V., Khanh T.H., Dong V.C., Qui P.T., Cam B.V., Ha Do Q., Guan Y., Peiris J.S., Chinh N.T., Hien T.T., Farrar J. *Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia.* Nat Med. 2006;12(10):1203-7.
74. Dinh P.N., Long H.T., Tien N.T., Hien N.T., Mai Le T.Q., Phong Le H., Tuan Le V., Van Tan H., Nguyen N.B., Van Tu P., Phuong N.T., World Health Organization/Global Outbreak A.Response Network Avian Influenza Investigation Team In V. *Risk factors for human infection with avian influenza A H5N1, Vietnam, 2004.* Emerg Infect Dis. 2006;12(12):1841-7.
75. Dipiazza A., Richards K.A., Knowlden Z.A., Nayak J.L., Sant A.J. *The Role of CD4 T Cell Memory in Generating Protective Immunity to Novel and Potentially Pandemic Strains of Influenza.* Front Immunol. 2016;7:10.
76. Dolfi D.V., Mansfield K.D., Kurupati R.K., Kannan S., Doyle S.A., Ertl H.C., Schmader K.E., Wherry E.J. *Vaccine-induced boosting of influenza virus-specific CD4 T cells in younger and aged humans.* PLoS One. 2013;8(10):e77164.
77. Dorner T., Radbruch A. *Antibodies and B cell memory in viral immunity.* Immunity. 2007;27(3):384-92.
78. Duan L., Campitelli L., Fan X.H., Leung Y.H., Vijaykrishna D., Zhang J.X., Donatelli I., Delogu M., Li K.S., Foni E., Chiapponi C., Wu W.L., Kai H., Webster R.G., Shortridge K.F., Peiris J.S., Smith G.J., Chen H., Guan Y. *Characterization of low-pathogenic H5 subtype*

influenza viruses from Eurasia: implications for the origin of highly pathogenic H5N1 viruses. J Virol. 2007;81(14):7529-39.

79. Ehrlich H.J., Muller M., Oh H.M., Tambyah P.A., Joukhadar C., Montomoli E., Fisher D., Berezuk G., Fritsch S., Low-Baselli A., Vartian N., Bobrovsky R., Pavlova B.G., Pollabauer E.M., Kistner O., Barrett P.N. Baxter H.N.P.I.V.C.S.T. *A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture.* N Engl J Med. 2008;358(24):2573-84.

80. Ekiert D.C., Friesen R.H., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H.J., Brandenburg B., Vogels R., Brakenhoff J.P., Kompier R., Koldijk M.H., Cornelissen L.A., Poon L.L., Peiris M., Koudstaal W., Wilson I.A. Goudsmit J. *A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses.* Science. 2011;333(6044):843-50.

81. Elhefnawi M., Alaidi O., Mohamed N., Kamar M., El-Azab I., Zada S. Siam R. *Identification of novel conserved functional motifs across most Influenza A viral strains.* Virol J. 2011;8:44.

82. Ellebedy A.H., Krammer F., Li G.M., Miller M.S., Chiu C., Wrammert J., Chang C.Y., Davis C.W., Mccausland M., Elbein R., Edupuganti S., Spearman P., Andrews S.F., Wilson P.C., Garcia-Sastre A., Mulligan M.J., Mehta A.K., Palese P. Ahmed R. *Induction of broadly cross-reactive antibody responses to the influenza HA stem region following H5N1 vaccination in humans.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(36):13133-8.

83. Epstein S.L. *Prior H1N1 influenza infection and susceptibility of Cleveland Family Study participants during the H2N2 pandemic of 1957: an experiment of nature.* J Infect Dis. 2006;193(1):49-53.
84. Epstein S.L., Kong W.P., Misplon J.A., Lo C.Y., Tumpey T.M., Xu L., Nabel G.J. *Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein.* Vaccine. 2005;23(46-47):5404-10.
85. 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;49(3):552-8.
86. Forrest B.D., Pride M.W., Dunning A.J., Capeding M.R., Chotpitayasunondh T., Tam J.S., Rappaport R., Eldridge J.H., Gruber W.C. *Correlation of cellular immune responses with protection against culture-confirmed influenza virus in young children.* Clin Vaccine Immunol. 2008;15(7):1042-53.
87. Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B., Osterhaus A.D. *Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls.* J Virol. 2005;79(5):2814-22.
88. Fowler K.B., Gupta V., Sullender W., Broor S., Widdowson M.A., Lal R.B., Krishnan A. *Incidence of symptomatic A(H1N1)pdm09 influenza during the pandemic and post-pandemic periods in a rural Indian community.* Int J Infect Dis. 2013;17(12):e1182-5.

89. G.F. P. *The Diffusion of Influenza: Patterns and Paradigms*. Rowman & Littlefield. 1986.
90. Galli G., Medini D., Borgogni E., Zedda L., Bardelli M., Malzone C., Nuti S., Tavarini S., Sammiceli C., Hilbert A.K., Brauer V., Banzhoff A., Rappuoli R., Del Giudice G., Castellino F. *Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4+ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(10):3877-82.
91. Glaser L., Zamarin D., Acland H.M., Spackman E., Palese P., Garcia-Sastre A., Tewari D. *Sequence analysis and receptor specificity of the hemagglutinin of a recent influenza H2N2 virus isolated from chicken in North America*. Glycoconj J. 2006;23(1-2):93-9.
92. 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;198(5):635-41.
93. Grant E., Wu C., Chan K.F., Eckle S., Bharadwaj M., Zou Q.M., Kedzierska K., Chen W. *Nucleoprotein of influenza A virus is a major target of immunodominant CD8+ T-cell responses*. Immunol Cell Biol. 2013;91(2):184-94.
94. Grebe K.M., Yewdell J.W., Bennink J.R. *Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand?* Microbes Infect. 2008;10(9):1024-9.

95. Greenbaum J.A., Kotturi M.F., Kim Y., Oseroff C., Vaughan K., Salimi N., Vita R., Ponomarenko J., Scheuermann R.H., Sette A.Peters B. *Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(48):20365-70.
96. Hayden F.G., Howard W.A., Palkonyay L.Kieny M.P. *Report of the 5th meeting on the evaluation of pandemic influenza prototype vaccines in clinical trials: World Health Organization, Geneva, Switzerland, 12-13 February 2009*. Vaccine. 2009;27(31):4079-89.
97. He X.S., Holmes T.H., Zhang C., Mahmood K., Kemble G.W., Lewis D.B., Dekker C.L., Greenberg H.B.Arvin A.M. *Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines*. J Virol. 2006;80(23):11756-66.
98. He X.S., Sasaki S., Narvaez C.F., Zhang C., Liu H., Woo J.C., Kemble G.W., Dekker C.L., Davis M.M.Greenberg H.B. *Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination*. J Immunol Methods. 2011;365(1-2):67-75.
99. Hehme N., Engelmann H., Kunzel W., Neumeier E.Sanger R. *Pandemic preparedness: lessons learnt from H2N2 and H9N2 candidate vaccines*. Med Microbiol Immunol. 2002;191(3-4):203-8.
100. Henderson D.A., Courtney B., Inglesby T.V., Toner E.Nuzzo J.B. *Public health and medical responses to the 1957-58 influenza pandemic*. Biosecur Bioterror. 2009;7(3):265-73.

101. Hillaire M.L., Vogelzang-Van Trierum S.E., Kreijtz J.H., De Mutsert G., Fouchier R.A., Osterhaus A.D.Rimmelzwaan G.F. *Human T-cells directed to seasonal influenza A virus cross-react with 2009 pandemic influenza A (H1N1) and swine-origin triple-reassortant H3N2 influenza viruses.* J Gen Virol. 2013;94(Pt 3):583-92.
102. Ilyicheva T., Abdurashitov M., Durymanov A., Susloparov I., Goncharova N., Kolosova N., Mikheev V.Ryzhikov A. *Herd immunity and fatal cases of influenza among the population exposed to poultry and wild birds in Russian Asia in 2013-2014.* J Med Virol. 2016;88(1):35-44.
103. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G., Den Bosch H., Klimov A., Rudenko L., Cox N.J.Donis R.O. *Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2).* Virology. 2011;412(2):297-305.
104. Isakova-Sivak I., Stukova M., Erofeeva M., Naykhin A., Donina S., Petukhova G., Kuznetsova V., Kiseleva I., Smolonogina T., Dubrovina I., Pisareva M., Nikiforova A., Power M., Flores J.Rudenko L. *H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers.* Hum Vaccin Immunother. 2015;11(4):970-82.
105. Jackson C. *History lessons: the Asian flu pandemic.* Br J Gen Pract. 2009;59(565):622-3.

106. Juno J., Fowke K.R., Keynan Y. *Immunogenetic factors associated with severe respiratory illness caused by zoonotic H1N1 and H5N1 influenza viruses*. Clin Dev Immunol. 2012;2012:797180.
107. Kandun I.N., Wibisono H., Sedyaningsih E.R., Yusharmen, Hadisoedarsuno W., Purba W., Santoso H., Septiawati C., Tresnaningsih E., Heriyanto B., Yuwono D., Harun S., Soeroso S., Giriputra S., Blair P.J., Jeremijenko A., Kosasih H., Putnam S.D., Samaan G., Silitonga M., Chan K.H., Poon L.L., Lim W., Klimov A., Lindstrom S., Guan Y., Donis R., Katz J., Cox N., Peiris M., Uyeki T.M. *Three Indonesian clusters of H5N1 virus infection in 2005*. N Engl J Med. 2006;355(21):2186-94.
108. Karron R.A., Talaat K., Luke C., Callahan K., Thumar B., Dilorenzo S., Mcauliffe J., Schappell E., Suguitan A., Mills K., Chen G., Lamirande E., Coelingh K., Jin H., Murphy B.R., Kemble G., Subbarao K. *Evaluation of two live attenuated cold-adapted H5N1 influenza virus vaccines in healthy adults*. Vaccine. 2009;27(36):4953-60.
109. Kawaoka Y., Krauss S., Webster R.G. *Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics*. J Virol. 1989;63(11):4603-8.
110. Kayali G., Kandeil A., El-Shesheny R., Kayed A.S., Gomaa M.M., Maatouq A.M., Shehata M.M., Moatasim Y., Bagato O., Cai Z., Rubrum A., Kutkat M.A., McKenzie P.P., Webster R.G., Webby R.J., Ali M.A. *Active surveillance for avian influenza virus, Egypt, 2010-2012*. Emerg Infect Dis. 2014;20(4):542-51.

111. Kilpatrick A.M., Chmura A.A., Gibbons D.W., Fleischer R.C., Marra P.P., Daszak P. *Predicting the global spread of H5N1 avian influenza*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(51):19368-73.
112. Knowlden Z.A., Sant A.J. *CD4 T cell epitope specificity determines follicular versus non-follicular helper differentiation in the polyclonal response to influenza infection or vaccination*. Sci Rep. 2016;6:28287.
113. Kogure T., Suzuki T., Takahashi T., Miyamoto D., Hidari K.I., Guo C.T., Ito T., Kawaoka Y., Suzuki Y. *Human trachea primary epithelial cells express both sialyl(alpha2-3)Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl(alpha2-6)Gal receptor for human influenza viruses*. Glycoconj J. 2006;23(1-2):101-6.
114. Krammer F., Palese P. *Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines*. Curr Opin Virol. 2013;3(5):521-30.
115. Krammer F., Palese P., Steel J. *Advances in universal influenza virus vaccine design and antibody mediated therapies based on conserved regions of the hemagglutinin*. Curr Top Microbiol Immunol. 2015;386:301-21.
116. Krause J.C., Tsibane T., Tumpey T.M., Huffman C.J., Albrecht R., Blum D.L., Ramos I., Fernandez-Sesma A., Edwards K.M., Garcia-Sastre A., Basler C.F., Crowe J.E., Jr. *Human monoclonal antibodies to pandemic 1957 H2N2 and pandemic 1968 H3N2 influenza viruses*. J Virol. 2012;86(11):6334-40.

117. Kreijtz J.H., De Mutsert G., Van Baalen C.A., Fouchier R.A., Osterhaus A.D.Rimmelzwaan G.F. *Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus.* J Virol. 2008;82(11):5161-6.
118. Kreijtz J.H., Fouchier R.A.Rimmelzwaan G.F. *Immune responses to influenza virus infection.* Virus Res. 2011;162(1-2):19-30.
119. Kubota-Koketsu R., Yunoki M., Okuno Y.Ikuta K. *Significant neutralizing activities against H2N2 influenza A viruses in human intravenous immunoglobulin lots manufactured from 1993 to 2010.* Biologics. 2012;6:245-7.
120. Kunkel E.J.Butcher E.C. *Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes.* Immunity. 2002;16(1):1-4.
121. Kunkel E.J.Butcher E.C. *Plasma-cell homing.* Nat Rev Immunol. 2003;3(10):822-9.
122. Lai S., Qin Y., Cowling B.J., Ren X., Wardrop N.A., Gilbert M., Tsang T.K., Wu P., Feng L., Jiang H., Peng Z., Zheng J., Liao Q., Li S., Horby P.W., Farrar J.J., Gao G.F., Tatem A.J.Yu H. *Global epidemiology of avian influenza A H5N1 virus infection in humans, 1997-2015: a systematic review of individual case data.* Lancet Infect Dis. 2016;16(7):e108-18.
123. Lanthier P.A., Huston G.E., Moquin A., Eaton S.M., Szaba F.M., Kummer L.W., Tighe M.P., Kohlmeier J.E., Blair P.J., Broderick M., Smiley S.T.Haynes L. *Live attenuated influenza vaccine (LAIV) impacts innate and adaptive immune responses.* Vaccine. 2011;29(44):7849-56.

124. Ledgerwood J.E., Wei C.J., Hu Z., Gordon I.J., Enama M.E., Hendel C.S., Mctamney P.M., Pearce M.B., Yassine H.M., Boyington J.C., Bailer R., Tumpey T.M., Koup R.A., Mascola J.R., Nabel G.J., Graham B.S.Team V.R.C.S. *DNA priming and influenza vaccine immunogenicity: two phase 1 open label randomised clinical trials*. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(12):916-24.
125. Li W., Li M., Deng G., Zhao L., Liu X.Wang Y. *Prime-boost vaccination with Bacillus Calmette Guerin and a recombinant adenovirus co-expressing CFP10, ESAT6, Ag85A and Ag85B of Mycobacterium tuberculosis induces robust antigen-specific immune responses in mice*. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):3073-80.
126. Liem N.T., Tung C.V., Hien N.D., Hien T.T., Chau N.Q., Long H.T., Hien N.T., Mai Le Q., Taylor W.R., Wertheim H., Farrar J., Khang D.D.Horby P. *Clinical features of human influenza A (H5N1) infection in Vietnam: 2004-2006*. *Clin Infect Dis*. 2009;48(12):1639-46.
127. Lillie P.J., Berthoud T.K., Powell T.J., Lambe T., Mullarkey C., Spencer A.J., Hamill M., Peng Y., Blais M.E., Duncan C.J., Sheehy S.H., Havelock T., Faust S.N., Williams R.L., Gilbert A., Oxford J., Dong T., Hill A.V.Gilbert S.C. *Preliminary assessment of the efficacy of a T-cell-based influenza vaccine, MVA-NP+M1, in humans*. *Clin Infect Dis*. 2012;55(1):19-25.
128. Lin J., Zhang J., Dong X., Fang H., Chen J., Su N., Gao Q., Zhang Z., Liu Y., Wang Z., Yang M., Sun R., Li C., Lin S., Ji M., Liu Y., Wang X., Wood J., Feng Z., Wang Y.Yin W. *Safety and immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1) vaccine: a phase I randomised controlled trial*. *Lancet*. 2006;368(9540):991-7.

129. Lindstrom S.E. C.N.J., Klimov A. *Evolutionary analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses: evidence for genetic divergence and multiple reassortment among H2N2 and/or H3N2 viruses*. International Congress Series. 2004;Volume 1263, (June 2004,):Pages 184-190.
130. Lucas M., Day C.L., Wyer J.R., Cunliffe S.L., Loughry A., Mcmichael A.J.Klenerman P. *Ex vivo phenotype and frequency of influenza virus-specific CD4 memory T cells*. J Virol. 2004;78(13):7284-7.
131. Luke C.J.Subbarao K. *Improving pandemic H5N1 influenza vaccines by combining different vaccine platforms*. Expert Rev Vaccines. 2014;13(7):873-83.
132. Ma W., Brenner D., Wang Z., Dauber B., Ehrhardt C., Hogner K., Herold S., Ludwig S., Wolff T., Yu K., Richt J.A., Planz O.Pleschka S. *The NS segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism, and host range of an H7N1 HPAIV*. J Virol. 2010;84(4):2122-33.
133. Ma W., Vincent A.L., Gramer M.R., Brockwell C.B., Lager K.M., Janke B.H., Gauger P.C., Patnayak D.P., Webby R.J.Richt J.A. *Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(52):20949-54.
134. Matsuoka Y., Lamirande E.W.Subbarao K. *The mouse model for influenza*. Curr Protoc Microbiol. 2009;Chapter 15:Unit 15G 3.

135. Mc Elhaney J.E., Pinkoski M.J., Meneilly G.S. *Changes in CD45 isoform expression vary according to the duration of T-cell memory after vaccination.* Clin Diagn Lab Immunol. 1995;2(1):73-81.
136. Mc Heyzer-Williams L.J., Mc Heyzer-Williams M.G. *Antigen-specific memory B cell development.* Annu Rev Immunol. 2005;23:487-513.
137. McMichael A.J., Gotch F.M., Dongworth D.W., Clark A., Potter C.W. *Declining T-cell immunity to influenza, 1977-82.* Lancet. 1983;2(8353):762-4.
138. McMichael A.J., Gotch F.M., Noble G.R., Beare P.A. *Cytotoxic T-cell immunity to influenza.* N Engl J Med. 1983;309(1):13-7.
139. Miller J.D., Van Der Most R.G., Akondy R.S., Glidewell J.T., Albott S., Masopust D., Murali-Krishna K., Mahar P.L., Edupuganti S., Lalor S., Germon S., Del Rio C., Mulligan M.J., Staprans S.I., Altman J.D., Feinberg M.B., Ahmed R. *Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines.* Immunity. 2008;28(5):710-22.
140. Min J.Y., Vogel L., Matsuoka Y., Lu B., Swayne D., Jin H., Kemble G., Subbarao K. *A live attenuated H7N7 candidate vaccine virus induces neutralizing antibody that confers protection from challenge in mice, ferrets, and monkeys.* J Virol. 2010;84(22):11950-60.
141. Mok K.P., Wong C.H., Cheung C.Y., Chan M.C., Lee S.M., Nicholls J.M., Guan Y., Peiris J.S. *Viral genetic determinants of H5N1 influenza viruses that contribute to cytokine dysregulation.* J Infect Dis. 2009;200(7):1104-12.

142. Monsalvo A.C., Batalle J.P., Lopez M.F., Krause J.C., Klemenc J., Hernandez J.Z., Maskin B., Bugna J., Rubinstein C., Aguilar L., Dalurzo L., Libster R., Savy V., Baumeister E., Aguilar L., Cabral G., Font J., Solari L., Weller K.P., Johnson J., Echavarria M., Edwards K.M., Chappell J.D., Crowe J.E., Jr., Williams J.V., Melendi G.A., Polack F.P. *Severe pandemic 2009 H1N1 influenza disease due to pathogenic immune complexes*. Nat Med. 2011;17(2):195-9.
143. Mounts A.W., Kwong H., Izurieta H.S., Ho Y., Au T., Lee M., Buxton Bridges C., Williams S.W., Mak K.H., Katz J.M., Thompson W.W., Cox N.J., Fukuda K. *Case-control study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease, Hong Kong, 1997*. J Infect Dis. 1999;180(2):505-8.
144. Munster V.J., Wallensten A., Baas C., Rimmelzwaan G.F., Schutten M., Olsen B., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. *Mallards and highly pathogenic avian influenza ancestral viruses, northern Europe*. Emerg Infect Dis. 2005;11(10):1545-51.
145. N. O.F.H. Group W.E.W. *Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1)*. Emerg Infect Dis. 2008;14(7):e1.
146. Nabel G.J., Wei C.J., Ledgerwood J.E. *Vaccinate for the next H2N2 pandemic now*. Nature. 2011;471(7337):157-8.
147. Neiryck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W.M., Fiers W. *A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein*. Nat Med. 1999;5(10):1157-63.

148. Nelson R. *Influenza A H2N2 saga remains unexplained*. Lancet Infect Dis. 2005;5(6):332.
149. Nicholson K.G., Colegate A.E., Podda A., Stephenson I., Wood J., Ypma E., Zambon M.C. *Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza*. Lancet. 2001;357(9272):1937-43.
150. Ogwang C., Kimani D., Edwards N.J., Roberts R., Mwacharo J., Bowyer G., Bliss C., Hodgson S.H., Njuguna P., Viebig N.K., Nicosia A., Gitau E., Douglas S., Illingworth J., Marsh K., Lawrie A., Imoukhuede E.B., Ewer K., Urban B.C., Av S.H., Bejon P., Group M. *Prime-boost vaccination with chimpanzee adenovirus and modified vaccinia Ankara encoding TRAP provides partial protection against Plasmodium falciparum infection in Kenyan adults*. Sci Transl Med. 2015;7(286):286re5.
151. Ohshima N., Kubota-Koketsu R., Iba Y., Okuno Y., Kurosawa Y. *Two types of antibodies are induced by vaccination with A/California/2009 pdm virus: binding near the sialic acid-binding pocket and neutralizing both H1N1 and H5N1 viruses*. PLoS One. 2014;9(2):e87305.
152. Peiris J.S., Yu W.C., Leung C.W., Cheung C.Y., Ng W.F., Nicholls J.M., Ng T.K., Chan K.H., Lai S.T., Lim W.L., Yuen K.Y., Guan Y. *Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease*. Lancet. 2004;363(9409):617-9.

153. Petukhova G., Korenkov D., Chirkova T., Donina S., Rudenko L., Naikhin A. *B- and T-cell memory elicited by a seasonal live attenuated reassortant influenza vaccine: assessment of local antibody avidity and virus-specific memory T-cells using trogocytosis-based method.* Influenza Other Respir Viruses. 2012;6(2):119-26.
154. Petukhova G., Naikhin A., Chirkova T., Donina S., Korenkov D., Rudenko L. *Comparative studies of local antibody and cellular immune responses to influenza infection and vaccination with live attenuated reassortant influenza vaccine (LAIV) utilizing a mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT) separation method.* Vaccine. 2009;27(19):2580-7.
155. 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;71(8):4808-14.
156. Quinones-Parra S., Loh L., Brown L.E., Kedzierska K., Valkenburg S.A. *Universal immunity to influenza must outwit immune evasion.* Front Microbiol. 2014;5:285.
157. Raude J., Caille-Brillet A.L., Setbon M. *The 2009 pandemic H1N1 influenza vaccination in France: who accepted to receive the vaccine and why?* PLoS Curr. 2010;2:RRN1188.
158. Refaey S., Azziz-Baumgartner E., Amin M.M., Fahim M., Roguski K., Elaziz H.A., Iuliano A.D., Salah N., Uyeki T.M., Lindstrom S., Davis C.T., Eid A., Genedy M., Kandeel A.

Increased Number of Human Cases of Influenza Virus A(H5N1) Infection, Egypt, 2014-15. Emerg Infect Dis. 2015;21(12):2171-3.

159. Roti M., Yang J., Berger D., Huston L., James E.A.Kwok W.W. *Healthy human subjects have CD4+ T cells directed against H5N1 influenza virus.* J Immunol. 2008;180(3):1758-68.

160. 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;37(4):937-43.

161. Rudenko L., Desheva J., Korovkin S., Mironov A., Rekestin A., Grigorieva E., Donina S., Gambaryan A.Katlinsky A. *Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant H5 vaccine (phase I-II clinical trials).* Influenza Other Respir Viruses. 2008;2(6):203-9.

162. Rudenko L., Isakova-Sivak I.Donina S. *H7N3 live attenuated influenza vaccine has a potential to protect against new H7N9 avian influenza virus.* Vaccine. 2013;31(42):4702-5.

163. Rudenko L., Isakova-Sivak I., Naykhin A., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Korenkov D., Matyushenko V., Sparrow E.Kieny M.P. *H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial.* Lancet Infect Dis. 2016;16(3):303-10.

164. Rudenko L., Isakova-Sivak I., Rekstin A. *H7N9: can H7N3 live-attenuated influenza vaccine be used at the early stage of the pandemic?* Expert Rev Vaccines. 2014;13(1):1-4.
165. Rudenko L., Kiseleva I., Naykhin A.N., Erofeeva M., Stukova M., Donina S., Petukhova G., Pisareva M., Krivitskaya V., Grudin M., Buzitskaya Z., Isakova-Sivak I., Kuznetsova S., Larionova N., Desheva J., Dubrovina I., Nikiforova A., Victor J.C., 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;9(2):e87962.
166. Rudenko L., Van Den Bosch H., Kiseleva I., Mironov A., Naikhin A., Larionova N., Bushmenkov D. *Live attenuated pandemic influenza vaccine: clinical studies on A/17/California/2009/38 (H1N1) and licensing of the Russian-developed technology to WHO for pandemic influenza preparedness in developing countries.* Vaccine. 2011;29 Suppl 1:A40-4.
167. Russell R.J., Kerry P.S., Stevens D.J., Steinhauer D.A., Martin S.R., Gamblin S.J., Skehel J.J. *Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(46):17736-41.
168. Sakabe S., Iwatsuki-Horimoto K., Horimoto T., Nidom C.A., Le M., Takano R., Kubota-Koketsu R., Okuno Y., Ozawa M., Kawaoka Y. *A cross-reactive neutralizing monoclonal antibody protects mice from H5N1 and pandemic (H1N1) 2009 virus infection.* Antiviral Res. 2010;88(3):249-55.

169. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.
170. Sanz I., Wei C., Lee F.E., Anolik J. *Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells*. *Semin Immunol*. 2008;20(1):67-82.
171. Sasaki S., Jaimes M.C., Holmes T.H., Dekker C.L., Mahmood K., Kemble G.W., Arvin A.M., Greenberg H.B. *Comparison of the influenza virus-specific effector and memory B-cell responses to immunization of children and adults with live attenuated or inactivated influenza virus vaccines*. *J Virol*. 2007;81(1):215-28.
172. Saunders-Hastings P.R., Krewski D. *Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission*. *Pathogens*. 2016;5(4).
173. Sawai T., Itoh Y., Ozaki H., Isoda N., Okamoto K., Kashima Y., Kawaoka Y., Takeuchi Y., Kida H., Ogasawara K. *Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of apathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin*. *Immunology*. 2008;124(2):155-65.
174. Schafer J.R., Kawaoka Y., Bean W.J., Suss J., Senne D., Webster R.G. *Origin of the pandemic 1957 H2 influenza A virus and the persistence of its possible progenitors in the avian reservoir*. *Virology*. 1993;194(2):781-8.

175. Schrauder A., Schweiger B., Buchholz U., Haas W., Sagebiel D., Guignard A., Hellenbrand W. *Laboratory exposure to influenza A H2N2, Germany, 2004-2005*. Emerg Infect Dis. 2006;12(12):1997-8.
176. 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;16(11):1587-94.
177. Shinya K., Kawaoka Y. *Influenza virus receptors in the human airway*. Uirusu. 2006;56(1):85-9.
178. Sikkema R.S., Freidl G.S., De Bruin E., Koopmans M. *Weighing serological evidence of human exposure to animal influenza viruses - a literature review*. Euro Surveill. 2016;21(44).
179. Simon P.F., De La Vega M.A., Paradis E., Mendoza E., Coombs K.M., Kobasa D., Beauchemin C.A. *Avian influenza viruses that cause highly virulent infections in humans exhibit distinct replicative properties in contrast to human H1N1 viruses*. Sci Rep. 2016;6:24154.
180. Slepishkin A.N. *The effect of a previous attack of A1 influenza on susceptibility to A2 virus during the 1957 outbreak*. Bull World Health Organ. 1959;20(2-3):297-301.

181. Sommerfelt M.A. *T-cell-mediated and humoral approaches to universal influenza vaccines*. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(10):1359-61.
182. Squires B., Macken C., Garcia-Sastre A., Godbole S., Noronha J., Hunt V., Chang R., Larsen C.N., Klem E., Biersack K.Scheuermann R.H. *BioHealthBase: informatics support in the elucidation of influenza virus host pathogen interactions and virulence*. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D497-503.
183. Sridhar S., Begom S., Bermingham A., Hoschler K., Adamson W., Carman W., Bean T., Barclay W., Deeks J.J.Lalvani A. *Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza*. *Nat Med*. 2013;19(10):1305-12.
184. Stohr K. *Vaccinate before the next pandemic?* *Nature*. 2010;465(7295):161.
185. Subbarao E.K., Park E.J., Lawson C.M., Chen A.Y.Murphy B.R. *Sequential addition of temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design of a genetically engineered live influenza A virus vaccine*. *J Virol*. 1995;69(10):5969-77.
186. Subbarao K., Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H., Perdue M., Swayne D., Bender C., Huang J., Hemphill M., Rowe T., Shaw M., Xu X., Fukuda K.Cox N. *Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness*. *Science*. 1998;279(5349):393-6.

187. Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L.M., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M., Wan H., Murakami A., Yammanuru A., Han T., Cox N.J., Bankston L.A., Donis R.O., Liddington R.C., Marasco W.A. *Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses*. Nat Struct Mol Biol. 2009;16(3):265-73.
188. Suzuki Y., Nei M. *Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes*. Mol Biol Evol. 2002;19(4):501-9.
189. Talaat K.R., Karron R.A., Liang P.H., McMahon B.A., Luke C.J., Thumar B., Chen G.L., Min J.Y., Lamirande E.W., Jin H., Coelingh K.L., Kemble G.W., Subbarao K. *An open-label phase I trial of a live attenuated H2N2 influenza virus vaccine in healthy adults*. Influenza Other Respir Viruses. 2013;7(1):66-73.
190. Talaat K.R., Luke C.J., Khurana S., Manischewitz J., King L.R., McMahon B.A., Karron R.A., Lewis K.D., Qin J., Follmann D.A., Golding H., Neuzil K.M., Subbarao K. *A live attenuated influenza A(H5N1) vaccine induces long-term immunity in the absence of a primary antibody response*. J Infect Dis. 2014;209(12):1860-9.
191. Thueng-In K., Maneewatch S., Srimanote P., Songserm T., Tapchaisri P., Sookrung N., Tongtawe P., Channarong S., Chaicumpa W. *Heterosubtypic immunity to influenza mediated by liposome adjuvanted H5N1 recombinant protein vaccines*. Vaccine. 2010;28(41):6765-77.
192. Tian H., Zhou S., Dong L., Van Boeckel T.P., Cui Y., Newman S.H., Takekawa J.Y., Prosser D.J., Xiao X., Wu Y., Cazelles B., Huang S., Yang R., Grenfell B.T., Xu B. *Avian*

influenza H5N1 viral and bird migration networks in Asia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(1):172-7.

193. To K.K., Chan J.F., Chen H., Li L.Yuen K.Y. *The emergence of influenza A H7N9 in human beings 16 years after influenza A H5N1: a tale of two cities*. Lancet Infect Dis. 2013;13(9):809-21.

194. To K.K., Hung I.F., Li I.W., Lee K.L., Koo C.K., Yan W.W., Liu R., Ho K.Y., Chu K.H., Watt C.L., Luk W.K., Lai K.Y., Chow F.L., Mok T., Buckley T., Chan J.F., Wong S.S., Zheng B., Chen H., Lau C.C., Tse H., Cheng V.C., Chan K.H.Yuen K.Y. *Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection*. Clin Infect Dis. 2010;50(6):850-9.

195. To K.K., Zhang A.J., Hung I.F., Xu T., Ip W.C., Wong R.T., Ng J.C., Chan J.F., Chan K.H.Yuen K.Y. *High titer and avidity of nonneutralizing antibodies against influenza vaccine antigen are associated with severe influenza*. Clin Vaccine Immunol. 2012;19(7):1012-8.

196. Tran T.H., Nguyen T.L., Nguyen T.D., Luong T.S., Pham P.M., Nguyen V V., Pham T.S., Vo C.D., Le T.Q., Ngo T.T., Dao B.K., Le P.P., Nguyen T.T., Hoang T.L., Cao V.T., Le T.G., Nguyen D.T., Le H.N., Nguyen K.T., Le H.S., Le V.T., Christiane D., Tran T.T., Menno De J., Schultsz C., Cheng P., Lim W., Horby P., Farrar J. World Health Organization International Avian Influenza Investigative T. *Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam*. N Engl J Med. 2004;350(12):1179-88.

197. Treanor J., Wright P.F. *Immune correlates of protection against influenza in the human challenge model*. Dev Biol (Basel). 2003;115:97-104.
198. Tu W., Mao H., Zheng J., Liu Y., Chiu S.S., Qin G., Chan P.L., Lam K.T., Guan J., Zhang L., Guan Y., Yuen K.Y., Peiris J.S., Lau Y.L. *Cytotoxic T lymphocytes established by seasonal human influenza cross-react against 2009 pandemic H1N1 influenza virus*. J Virol. 2010;84(13):6527-35.
199. Ungchusak K., Auewarakul P., Dowell S.F., Kitphati R., Auwanit W., Puthavathana P., Uprasertkul M., Boonnak K., Pittayawonganon C., Cox N.J., Zaki S.R., Thawatsupha P., Chittaganpitch M., Khontong R., Simmerman J.M., Chunsutthiwat S. *Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1)*. N Engl J Med. 2005;352(4):333-40.
200. Uyeki T.M. *Global epidemiology of human infections with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses*. Respiriology. 2008;13 Suppl 1:S2-9.
201. Van De Sandt C.E., Kreijtz J.H., De Mutsert G., Geelhoed-Mieras M.M., Hillaire M.L., Vogelzang-Van Trierum S.E., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F. *Human cytotoxic T lymphocytes directed to seasonal influenza A viruses cross-react with the newly emerging H7N9 virus*. J Virol. 2014;88(3):1684-93.
202. Viboud C., Simonsen L., Fuentes R., Flores J., Miller M.A., Chowell G. *Global Mortality Impact of the 1957-1959 Influenza Pandemic*. J Infect Dis. 2016;213(5):738-45.
203. Welsh R.M., Selin L.K., Szomolanyi-Tsuda E. *Immunological memory to viral infections*. Annu Rev Immunol. 2004;22:711-43.

204. Wernery U., Joseph S., Tarello W., Theneyan M. *Serological response of houbara bustards to an H5N1 vaccine*. Vet Rec. 2006;158(24):840.
205. Wherry E.J., Ahmed R. *Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection*. J Virol. 2004;78(11):5535-45.
206. Wilkinson T.M., Li C.K., Chui C.S., Huang A.K., Perkins M., Liebner J.C., Lambkin-Williams R., Gilbert A., Oxford J., Nicholas B., Staples K.J., Dong T., Douek D.C., McMichael A.J., Xu X.N. *Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans*. Nat Med. 2012;18(2):274-80.
207. Wrammert J., Koutsonanos D., Li G.M., Edupuganti S., Sui J., Morrissey M., Mccausland M., Skountzou I., Hornig M., Lipkin W.I., Mehta A., Razavi B., Del Rio C., Zheng N.Y., Lee J.H., Huang M., Ali Z., Kaur K., Andrews S., Amara R.R., Wang Y., Das S.R., O'donnell C.D., Yewdell J.W., Subbarao K., Marasco W.A., Mulligan M.J., Compans R., Ahmed R., Wilson P.C. *Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection*. J Exp Med. 2011;208(1):181-93.
208. Wu C., Zanker D., Valkenburg S., Tan B., Kedzierska K., Zou Q.M., Doherty P.C., Chen W. *Systematic identification of immunodominant CD8+ T-cell responses to influenza A virus in HLA-A2 individuals*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(22):9178-83.
209. Xin K.Q., Jounai N., Someya K., Honma K., Mizuguchi H., Naganawa S., Kitamura K., Hayakawa T., Saha S., Takeshita F., Okuda K., Honda M., Klinman D.M., Okuda K. *Prime-*

boost vaccination with plasmid DNA and a chimeric adenovirus type 5 vector with type 35 fiber induces protective immunity against HIV. Gene Ther. 2005;12(24):1769-77.

210. Yewdell J.W., Bennink J.R., Smith G.L., Moss B. *Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82(6):1785-9.*

211. Yu X., Tsibane T., Mcgraw P.A., House F.S., Keefer C.J., Hicar M.D., Tumpey T.M., Pappas C., Perrone L.A., Martinez O., Stevens J., Wilson I.A., Aguilar P.V., Altschuler E.L., Basler C.F., Crowe J.E., Jr. *Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. Nature. 2008;455(7212):532-6.*

212. Yuen K.Y., Chan P.K., Peiris M., Tsang D.N., Que T.L., Shortridge K.F., Cheung P.T., To W.K., Ho E.T., Sung R., Cheng A.F. *Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. Lancet. 1998;351(9101):467-71.*

213. Yunoki M., Kubota-Koketsu R., Urayama T., Sasaki T., Analiwa D., Konoshima Y., Ideno S., Fukunaga Y., Morikawa S., Hiroi S., Takahashi K., Okuno Y., Hagiwara K., Ikuta K. *Significant neutralizing activity of human immunoglobulin preparations against pandemic 2009 H1N1. Br J Haematol. 2010;148(6):953-5.*

214. Zeman A.M., Holmes T.H., Stamatis S., Tu W., He X.S., Bouvier N., Kemble G., Greenberg H.B., Lewis D.B., Arvin A.M., Dekker C.L. *Humoral and cellular immune responses in children given annual immunization with trivalent inactivated influenza vaccine. Pediatr Infect Dis J. 2007;26(2):107-15.*

215. Zhou B., Li Y., Speer S.D., Subba A., Lin X., Wentworth D.E. *Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses*. *Vaccine*. 2012;30(24):3691-702.

216. Zhu Q.Y., Qin E.D., Wang W., Yu J., Liu B.H., Hu Y., Hu J.F., Cao W.C. *Fatal infection with influenza A (H5N1) virus in China*. *N Engl J Med*. 2006;354(25):2731-2.

Приложение 1. Список иллюстративного материала

Таблица 4.1.1 Обнаружение у людей 18-45 лет сывороточных и локальных антител к различным подтипам вируса гриппа А.....	44
Таблица 4.1.2 Обнаружение антител к птичьим вирусам гриппа А/индюк/Турция/05/133(H5N2) у взрослых людей разного возраста.....	45
Таблица 4.1.3 Обнаружение у лиц разного возраста антител к вирусу гриппа А/Ленинград/134/17/57(H2N2).....	47
Таблица 4.1.4 Обнаружение антител к вирусу А/17/Калифорния/66/359(H2N2) у лиц не праймированных вирусом гриппа А (H2N2) в 1957-1968 гг.	48
Таблица 4.1.5 Обнаружение антител у людей локальных IgA-антител к различным подтипам вируса гриппа А в до- и постэпидемический сезон 2012-2013 гг.	48
Таблица 4.1.6 Обнаружение у людей разного возраста сывороточных антигемагглютинирующих антител к свиному и человеческому вирусам гриппа А (H3N2).	49
Рисунок 4.1.1. Обнаружение у взрослых людей 18-45 лет CD4+ и CD8+ Т-клеток к человеческим и птичьим вирусам гриппа А.....	50
Таблица 4.2.1 Частота гомологичных и гетерологичных гуморальных иммунных ответов волонтеров на прививку ЖГВ А/индюк/Турция/05/133(H5N2).	52
Таблица 4.2.2 Интенсивность гомологичных и гетерологичных гуморальных иммунных ответов у волонтеров после прививки ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2).	54
Таблица 4.2.3 Интенсивность гомологичных и гетерологичных гуморальных иммунных ответов на прививку ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2) у волонтеров с наличием поствакцинальных конверсий антител.....	55
Таблица 4.2.4. Число лиц с защитными титрами сывороточных и локальных антител после прививки ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2).	56

Таблица 4.2.5 Сопоставление результатов обнаружения у привитых ЖГВ H5N2 волонтеров гуморальных иммунных ответов к вакцинному вирусу А/индюк/Турция/05/133 (H5N2) в различных лабораторных тестах.	57
Таблица 4.2.6 Т-клеточный иммунный ответ у волонтеров, привитых ЖГВ H5N2.	58
Таблица 4.2.7 Итоговые индивидуальные данные о наличии достоверного гуморального и клеточного иммунного ответа у волонтеров, привитых живой гриппозной вакциной А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2).	59
Таблица 4.2.8 Частота гуморальных иммунных ответов волонтеров на ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2) произведенной и испытанной в Таиланде.	61
Таблица 4.2.9 Интенсивность гуморальных иммунных ответов волонтеров на ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2), произведенной и испытанной в Таиланде.	61
Таблица 4.2.10 Интенсивность гуморальных иммунных ответов на ЖГВ А/индюк/Турция/05/133 (H5N2) у волонтеров с наличием поствакцинальных конверсий антител (вакцина произведена и испытана в Таиланде).	62
Таблица 4.3.1 Интенсивность продукции антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих сывороточных антител после иммунизации волонтеров праймирующей ЖГВ H5N2 и бустерирующей ИГВ H5N1.	65
Таблица 4.3.2 Частота конверсий титров антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих сывороточных антител после иммунизации волонтеров праймирующей ЖГВ H5N2 и бустерирующей ИГВ H5N1.	66
Таблица 4.3.3 Частота конверсий и интенсивность продукции сывороточных IgA- и IgG-антител к вакцинному вирусу гриппа NIBRG-23(H5N1) после иммунизации волонтеров ИГВ H5N1.	68
Таблица 4.3.4 Интенсивность продукции сывороточных IgA- и IgG-антител к вирусу гриппа А/Индюк/Турция/65/133 (H5N2) после иммунизации волонтеров праймирующей ЖГВ H5N2 и бустерирующей ИГВ H5N1.	69
Таблица 4.3.5 Количественные показатели секреции <i>in vitro</i> IgA- и IgG-антител к вакцинному вирусу гриппа NIBRG-23(H5N1) после иммунизации волонтеров ИГВ H5N1.	70
Таблица 4.3.6 Сопоставление данных по фиксации в ИФА конверсий IgG-антител к вакцинному вирусу NIBRG-23 в сыворотках крови и в надосадках культур МПК у волонтеров, привитых ИГВ H5N1.	71
Таблица 4.3.7 Гуморальный иммунный ответ волонтеров (N=19) на праймирующую ЖГВ H5N2 в 2012 г. и бустерирующую ИГВ H5N1 в 2014 г.	72
Таблица 4.3.8 Авидность сывороточных IgA- и IgG-антител к вакцинному вирусу NIBRG-23 (H5N1) у привитых ИГВ H5N1 у волонтеров, не праймированных и праймированных ЖГВ H5N2.	73

Таблица 4.3.9 Т-клеточный иммунный ответ на иммунизацию ИГВ H5N1 у праймированных и не праймированных ЖГВ H5N2 волонтеров.....	74
Таблица 4.3.10 Влияние исходного уровня специфичных к вирусу гриппа А (H5N1)* CD8+Т-клеток иммунологической памяти на последующую после прививки ИГВ H5N1 интенсивность накопления этих клеток у волонтеров.	75
Таблица 4.4.1 Характеристики штаммов вируса гриппа H2N2, использовавшихся для заражения мышей.	78
Рисунок 4.4.1 Продукция сывороточных антигемагглютинирующих антител (РТГА) после первичной и повторной иммунизации.	80
Рисунок 4.4.2. Продукция локальных IgА-антител (ИФА) в верхних дыхательных путях после первичной и повторной иммунизации.	81
Рисунок 4.4.3. CD4+ и CD8+ Т-клетки в селезенке и НАЛТ после повторной иммунизации вирусами с единичными мутациями.	82
Рисунок 4.4.4. CD4+ и CD8+ Т-клетки (%) в селезенке мышей при первичном и вторичном иммунном ответе на вирусы гриппа А (H2N2) с комбинациями мутаций.....	83
Таблица 4.4.2 Суммарная оценка интенсивности гуморального и Т-клеточного иммунного ответа мышей на мутантные штаммы вируса гриппа А.	85