

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Прилипов А.Г., Альховский С.В., Львов Д.К. Анализ результатов надзора, лабораторной диагностики и выделения штаммов вирусов гриппа в базовых лабораториях ЦЭЭГ в период 2009–2011 гг. В кн.: Сборник статей и тезисов «Грипп: эпидемиология, профилактика и лечение», СПб.; 2011: 12–6.
2. Киселев О.И. Грипп и гриппоподобные инфекции. Бюллетень пленарного заседания Проблемной комиссии РАМН. СПб., 2010.
3. Киселев О.И. Геном пандемического вируса гриппа A/H1N1v-2009. М.: Димитрейд График Групп; 2011.
4. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: Бином; Лаборатория знаний; 2009.
5. Bhatt Samir, Holmes Edward C., Pybus Oliver G. The genomic rate of molecular adaptation of the human influenza A virus. *Mol. Biol. Evol.* J. 2011; 28(9): 2443–51.
6. Bouvier N. M., Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* J. 2008; 26: 49–53.
7. Byarugaba D. K., Ducatez M. F., Erima B., Mworosi E. A., Millard M., Kibuuka H. et al. Molecular epidemiology of influenza A/H3N2 viruses circulating in Uganda. *PLoS O* 2011; 6(11): e27803.
8. Davies H.W., Appleyard G., Cunnighan P., Pereira M.S. The use of continuous cell line for the isolation of influenza virus. *Bull. WHO.* 1978; 56: 1991–3.
9. Dapat I. C., Dapat C., Baranovich T., Suzuki Y., Kondo H., Shobugaw Y. et al. Genetic characterization of human Influenza viruses in the pandemic (2009–2010) and post-pandemic (2010–2011) periods in Japan. *PLoS ONE* J. 2012; 124: 15–22.
10. Harper S., Klimov A., Uyeke T., Fukuda K. *Influenza*. *Clin. Lab. Med.* J. 2002; 885: 863–82.
11. McCauley J., Daniels R., Lin Yi Pu, Zheng X., Gregory V., Whittaker L. et al. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere (14th–17th February 2011). London; 2011. vol. 70. URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/who-influenza-centre/annual-and-interim-reports/>
12. McCauley J., Daniels R., Lin Yi Pu, Zheng X., Gregory V., Whittaker L. et al. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere” (20th–22nd February 2012). London; 2012. vol. 70. URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/who-influenza-centre/annual-and-interim-reports/>
13. Nicholls H. Pandemic influenza: the inside story. *PLoS Boil. J.* 2006; 4: 0156–60.
14. Nelson M. I., Holmes E. C. The evolution of epidemic influenza. *Nat. Rev. genet.* 2007; 8(3): 196–205.

## REFERENCES

1. Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu, Kolobukhina L.V., Prilipov A.G., Alkhovskiy S.V., Lvov D.K. Analysis of the results of surveillance, laboratory diagnosis and isolation of strains of influenza viruses in laboratories TSEEG base in the period 2009–2011. In: *Influenza: epidemiology, prevention and treatment: Saint Petersburg*, 2011: 12–6 (in Russian).
2. Kiselev O.I. *InFluenza and InFluenza-like infection*. Saint Petersburg, 2010 (in Russian).
3. Kiselev O.I. *The Pandemic influenza virus genome A/H1N1v-2009*. Moscow; 2011 (in Russian).
4. Lukashov V.V. *Molecular evolution and phylogenetic analysis*. Moscow; 2009 (in Russian).
5. Bhatt Samir, Holmes Edward C., Pybus Oliver C. The genomic rate of molecular adaptation of the human influenza A virus. *Mol. Biol. Evol.* J. 2011; 2443–51.
6. Bouvier N. M., Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* J. 2008; 26: 49–53.
7. Byarugaba D. K., Ducatez M. F., Erima B., Mworosi E. A., Millard M., Kibuuka H. et al. Molecular epidemiology of influenza A/H3N2 viruses circulating in Uganda. *PLOSO* 2011; 6(11): e27803.
8. Davies H.W., Appleyard G., Cunnighan P., Pereira M.S. The use of continuous cell line for the isolation of influenza virus. *Bull. WHO.* 1978; 56: 1991–3.
9. Dapat I. C., Dapat C., Baranovich T., Suzuki Y., Kondo H., Shobugaw Y. et al. Genetic characterization of human influenza viruses in the pandemic (2009–2010) and post-pandemic (2010–2011) Periods in Japan. *PLoS ONE* J. 2012; 124: 15–22.
10. Harper S., Klimov A., Uyeke T., Fukuda K. *Influenza*. *Clin. Lab. Med.* J. 2002; 885: 863–82.
11. McCauley J., Daniels R., Lin Yi Pu, Zheng X., Gregory V., Whittaker L. et al. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere (14th–17th February 2011). London; 2011. vol. 70. URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/who-influenza-centre/annual-and-interim-reports/>
12. McCauley J., Daniels R., Lin Yi Pu, Zheng X., Gregory V., Whittaker L. et al. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere” (20th–22nd February 2012). London; 2012. vol. 70. URL: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/who-influenza-centre/annual-and-interim-reports/>
13. Nicholls H. Pandemic influenza: the inside story, *PLoS Biol. J.* 2006; 4: 0156–60.
14. Nelson M. I., Holmes E. C. The evolution of epidemic influenza. *Nat. Rev. J(genet)*, 2007; 8(3): 196–205.

Поступила 24.01.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013  
УДК 615.371:578.832.1].07

Т.А. Смолоногина<sup>1</sup>, Ю.А. Дешева<sup>1</sup>, А.Р. Рекстин<sup>1</sup>, А.Н. Миронов<sup>2</sup>, Л.Г. Руденко<sup>1</sup>

## Оценка антинейраминидазных антител в клинических испытаниях живой гриппозной вакцины «Орвакс» подтипа А(Н5N2)

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАН, 197376, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, 127051, Москва

В текущем исследовании изучено формирование антинейраминидазных антител (АТ) во время первой и второй фаз клинических испытаний живой гриппозной вакцины (ЖГВ) на основе вакцинного штамма А/17/утка/Потсдам/86/92(Н5N2). Для проведения твердофазной реакции ингибирования нейраминидазной активности (РИНА) подготовлен диагностический реассортантный вирус гриппа RN2/57-human A(H7N2), содержащий нейраминидазу (NA) от холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Показано, что двукратная прививка различными дозами моновалентной ЖГВ подтипа А(Н5N2) привела к статистически значимому увеличению титров АТ к NA вакцинного штамма, сопровождавшемуся 2-кратными сероконверсиями у 19,5–33,3% вакцинированных. Совпадение результатов двух тестов (реакция микронейтрализации и твердофазная РИНА) в отношении выявления или невыявления сероконверсий в одних и тех же парах сывороток крови у вакцинированных волонтеров составило 73,2%, при этом выявили статистическую взаимосвязь средней силы между достоверным приростом титров сывороточных нейтрализующих и антинейраминидазных АТ ( $p = 0,04$ ).

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина; нейраминидаза; антитела.

Контактная информация:

Смолоногина Татьяна Анатольевна, канд. биол. наук; e-mail: smolonogina@mail.ru

# Evaluation of the anti-neuraminidase antibodies in clinical trials of the live Influenza vaccine of the A(H5N2) subtype

T. A. Smolonogina<sup>1</sup>, Yu. A. Desheva<sup>1</sup>, A. R. Rekstin<sup>1</sup>, A. N. Mironov<sup>2</sup>, L. G. Rudenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia; <sup>2</sup> Scientific Center for Expertise of Medical Application Products, Moscow, Russia

In the current study, we evaluated the neuraminidase-inhibition (NI) antibodies among volunteers during the phase I and phase II of the clinical trials of a monovalent live attenuated influenza vaccine (LAIV) A/17/duck/Potsdam/86/92(H5N2). The reassortant influenza virus RN2/57-human A(H7N2) containing neuraminidase (NA) from the A/Leningrad/134/17/57(H2N2) was used in NI test. It was shown that two doses of the monovalent LAIV A(H5N2) led to a statistically significant increase in the NI antibodies to vaccine strain NA. More than twofold increase in antibodies was obtained among 19.5-33.3% of vaccinated. The microneutralization test and NI assay results coincidence in the same pairs of sera of the vaccinated volunteers was 73.2%, suggesting thus a statistically significant interdependence between the values of increase in antibodies revealed in both tests ( $p = 0.04$ ).

Key words: live attenuated Influenza vaccine; neuraminidase; antibody.

В связи с широким обсуждением вопроса о критериях оценки иммуногенности живой гриппозной вакцины (ЖГВ) особенно при регистрации новых вакцинных препаратов весьма актуальными являются исследования, касающиеся расширения спектра применяемых для этих целей иммунологических и серологических методик, что неоднократно отмечалось на совещаниях ВОЗ [1]. Одним из таких направлений являются оценка уровня АТ (АТ) к минорному поверхностному гликопротеину вируса гриппа нейраминидазе (NA) после инфекции и вакцинации и изучение защитного действия этих АТ. Как известно, антинейраминидазные АТ не уступают антигемагглютинирующим по значению в защите людей от гриппозной инфекции, являясь эффективными в ограничении распространения вируса в организме, снижении тяжести переносимого заболевания или предупреждении его развития [2, 3, 4]. Однако отсутствие стандартных методик определения содержания иммуноглобулинов указанной специфичности, а также недостаток экспериментальных и клинических данных затрудняют количественный подход к оценке их защитной эффективности, а следовательно, и разработку критериев иммуногенности гриппозных вакцин.

Ранее мы уже изучали формирование сывороточных АТ к NA штамма А/Калифорния/07/09(H1N1) у лиц, привитых моновалентной пандемической ЖГВ [5]. Для этой цели использовали разработанную на основе авторского диагностического reassortантного штамма модификацию твердофазной реакции ингибирования нейраминидазной активности (РИНА), способствующую повышению специфичности и чувствительности методики, обладающую необходимыми предпосылками для внедрения в широкую практику. В текущем исследовании с помощью твердофазной РИНА изучали формирование АТ к NA вакцинного штамма А/17/утка/Потсдам/86/92(H5N2) в сыворотках крови у волонтеров, принимавших участие в клинических испытаниях ЖГВ, разработанной для профилактики гриппа подтипа H5 [6], а также охарактеризовали уровень АТ к NA подтипа N2 у них до прививки.

## Материалы и методы

Исследуемые сыворотки крови получены при клиническом изучении серий моновалентной ЖГВ на основе вакцинного штамма А/17/утка/Потсдам/86/92(H5N2) производства ФГУП НПО «Микроген», которое провели в соответствии с протоколом исследования № ВГЖ-00/004/2006, согласованным с директором ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Вакцинный штамм А/17/утка/Потсдам/86/92(H5N2) представлял собой 7:1 reassortант, унаследовавший ген гемагглютинина (HA) от апатогенного птичьего вируса А/утка/Потсдам/1402-6/86(H5N2) и остальные гены, кодирующие внутренние, неструктурные белки и NA, от

донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2) [7]. Изучение препарата, осуществлявшееся на клинической базе Военного госпиталя № 1137, включало два этапа. Первый этап проводили на 18 добровольцах, которые получили двукратную прививку ЖГВ А(H5N2) в дозе 6,9 Ig ЭИД<sub>50</sub>/0,5 мл. Во время второго этапа изучения 41 доброволец был двукратно привит ЖГВ А(H5N2) в дозе 8,3 Ig ЭИД<sub>50</sub>/0,5, при этом в исследование включили группу плацебо ( $n = 7$ ).

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили с вакцинным штаммом в 96-луночных панелях для серологических реакций с использованием 0,75% взвеси эритроцитов человека по описанным методикам [8]. Для удаления термолabileльных ингибиторов сыворотки прогревали при 56–58°C в течение 30 мин. Для удаления термостабильных ингибиторов гемагглютинации исследуемые сыворотки обрабатывали экстрактом NA холерных вибрионов (Denka Seiken Co., LTD). Титры антигемагглютинирующих АТ выражали как величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, при котором наблюдали торможение гемагглютинации.

Реакция микронеутрализации (РН). РН с вакцинным вирусом А(H5N2) проводили в клеточной культуре MDCK по ранее опубликованной методике [8]. Титр сыворотки определяли как величину, обратную наивысшему разведению образца, дающему при длине волны 630 нм оптическую плотность (ОП), которая превышает пороговое значение, равное полусумме ОП для клеточного и вирусного контроля. За достоверную сероконверсию принят 4- и более кратный прирост титра нейтрализующих АТ.

Твердофазную РИНА проводили по протоколу, основанному на опубликованной ранее методике С. Lambre и соавт. [9].

Для повышения специфичности методики выявления АТ к NA вакцинного вируса использовали диагностический reassortантный штамм RN2/57-human A(H7N2), подготовленный на основе вируса гриппа лошади А/лошадь/Прага/1/56(H7N7), содержащий NA от холодаадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2). При выборе рабочей дозы вируса исследовали зависимость выхода продукта сиалидазной реакции, осуществляемой NA диагностического reassortанта при оптимальном pH буферного раствора, от концентрации вируса, выраженной в гемагглютинирующих единицах (АЕ). Таким образом, определили следующие условия постановки твердофазной РИНА: доза вируса 128 АЕ/50 мкл; время протекания реакции 1 ч.

Титр сывороточных антинейраминидазных АТ определяли как величину, обратную разведению образца, дающему 50% ингибирование активности NA. Сероконверсией считали увеличение титра АТ в 2 раза и более [10].

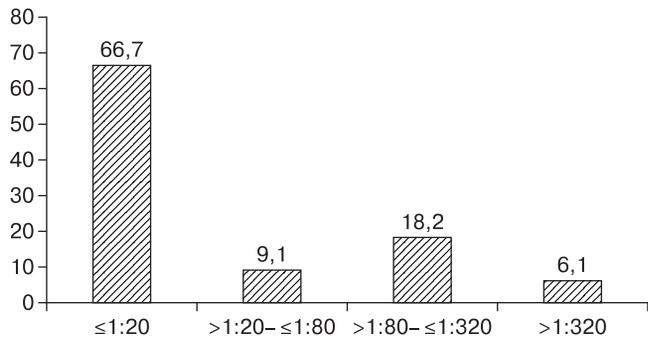


Рис. 1. Распределение титров сывороточных АТ к NA штамма А/Ленинград/134/17/57(Н2N2) у 66 волонтеров 18–60 лет до прививки ЖГВ А(Н5N2) (2006–2007).

Данные твердофазной РИНА с диагностическим реассортантным штаммом А(Н7N2). По оси абсцисс – уровень АТ (в титрах) к NA подтипа N2 в сыворотках крови у волонтеров; по оси ординат – доля (%) лиц с различным уровнем антинейраминидазных АТ

Статистическая обработка результатов. Для представления полученных данных использовали следующие показатели описательной статистики: среднегеометрический титр (СГТ), медиану (Me) и квартили (Q1; Q3). Статистическую значимость различий оценивали с помощью статистического пакета «Statistica» (версия 6,0) при использовании критерия Манна–Уитни, критерия знаковых рангов Уилкоксона или двустороннего варианта точного критерия Фишера. Мерой силы статистической взаимосвязи при анализе номинальных данных служил критерий V Крамера. Проверяемые критериями нулевые гипотезы отвергали при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Данные о формировании антинейраминидазных АТ после двукратной иммунизации ЖГВ на основе штамма А/17/утка/Потсдам/86/92(Н5N2) на каждой стадии клинических испытаний были получены с помощью твердофазной РИНА с диагностическим реассортантом RN2/57-human А(Н7N2) после того, как была подтверждена специфичность методики. Так, после двукратной вакцинации штаммом А/17/утка/Потсдам/86/92(Н5N2) в дозе 6,9 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,5 мл у исходно серонегативных волонтеров наблюдали статистически значимый прирост СГТ антигемагглютинирующих АТ к вирусу А(Н5N2) ( $p < 0,03$ ;  $n=18$ ). В то же время ни в одном из образцов, полученных после иммунизации ЖГВ подтипа А(Н5N2), титр антигемагглютинирующих АТ к штамму А/лошадь/Прага/1/56(Н7N7) не превысил порога чувствительности метода (данные не показаны), что свидетельствовало об антигенной отдаленности НА вируса А/лошадь/Прага/1/56(Н7N7) от шифтового варианта вируса гриппа А подтипа Н5 и обосновывало объективность результатов твердофазной РИНА даже в присутствии в исследуемых сыворотках крови АТ к главному поверхностному антигену вакцинного штамма.

У обследованных в 2006–2007 гг. волонтеров в возрасте от 18 до 60 лет еще до прививки моновалентной ЖГВ подтипа А(Н5N2) отметили уровень АТ к NA штамма А/Ленинград/134/17/57(Н2N2) (рис. 1). Так, у 33,3% обследованных (95% доверительный интервал (ДИ) 23,2–45,3%) титр антинейраминидазных АТ по данным твердофазной РИНА с диагностическим реассортантом RN2/57-human А(Н7N2) превышал значение 1:20. СГТ АТ для указанной группы из 22 волонтеров составил 1:158. Распределение лиц с высоким титром АТ к N2 по группам добровольцев, иммунизированных моновалентной ЖГВ в первой и второй фазах клинических испыта-

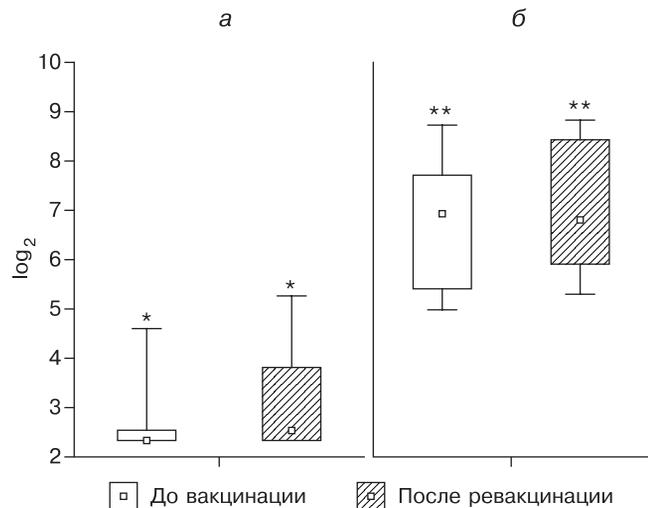


Рис. 2. Формирование антинейраминидазных АТ у волонтеров 18–60 лет, двукратно привитых моновалентной ЖГВ А(Н5N2), в зависимости от исходного уровня АТ к NA вакцинного штамма.

а – серонегативные волонтеры ( $n=26$ ), б – серопозитивные ( $n=15$ ). Данные твердофазной РИНА с диагностическим реассортантом А(Н7N2). По оси ординат – титры АТ (в  $\log_2$ ) к NA вакцинного штамма А/17/утка/Потсдам/86/92(Н5N2). На диаграмме размаха отмечены медиана, верхняя и нижняя квартили, максимальное и минимальное значения.  
\* –  $p = 0,002$ ; \*\* –  $p = 0,13$ .

ний, не было равномерным: 4 (22,2%) из 18 и 15 (36,6%) из 41 соответственно. Располагая точной информацией о дате рождения 18 участвовавших в первой фазе клинических испытаний добровольцев, мы провели анализ влияния возрастного фактора на допрививочный уровень антинейраминидазных АТ указанной специфичности. Согласно критерию Манна–Уитни средний титр АТ к N2 штамма А/Ленинград/134/17/57(Н2N2) среди лиц, родившихся в 1957–1962 гг. ( $Me = 1:169$ ;  $n = 4$ ), статистически значимо выше аналогичного показателя у обследованных 1963–1985 гг. рождения ( $Me = 1:5$ ,  $n = 14$ ): выборочная статистика критерия и достигнутый уровень значимости составили  $U = 0$ ;  $Z = 3,2645$  и  $p = 0,001$  соответственно.

На первом этапе клинических испытаний, направленном на изучение безвредности и ареактогенности вакцины, не исключавшем группу для препарата плацебо, ЖГВ вводили интраназально в дозе 6,9 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,5 мл (см. таблицу). Согласно непараметрическому критерию Уилкоксона двукратная прививка с интервалом в 21 день не только эффективно стимулировала выработку нейтрализующих АТ к штамму А/17/утка/Потсдам/86/92(Н5N2) ( $T = 0$ ;  $Z = 3,2958$ ;  $p = 0,001$ ), но и привела к статистически значимому увеличению титров антинейраминидазных АТ к гомологичному антигену ( $T = 6$ ;  $Z = 2,4006$ ;  $p = 0,016$ ).

Второй этап клинических испытаний проводили по аналогичному прививочному плану с увеличением дозы вируса до 8,3 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,5 мл и участием группы плацебо (см. табл. 1). Согласно РИ и твердофазной РИНА исходный иммунологический статус у вакцинированных добровольцев и волонтеров, получивших препарат плацебо, не различался (критерий Манна–Уитни,  $p > 0,05$ ). Спустя 3 нед после второй прививки титр нейтрализующих АТ к штамму А(Н5N2) в вакцинной группе был статистически значимо выше соответствующего показателя на момент начала клинических испытаний (критерий Уилкоксона:  $T = 0$ ;  $Z = 4,5407$ ;  $p < 0,0001$ ). Последнее утверждение справедливо и для титров АТ к N2 вакцинного штамма (критерий Уилкоксона:  $T = 49$ ;  $Z = 3,5068$ ;  $p = 0,0005$ ). У лиц, получивших препарат плацебо, не

**Формирование сывороточных АТ к поверхностным гликопротеинам штамма А/17/утка/Потсдам/86/92(Н5N2) у волонтеров 18–60 лет, двукратно привитых моновалентной ЖГВ «Орвакс». По данным РН и твердофазной РИНА с диагностическим реассортантом А(Н7N2)**

Препарат	n	Нейтрализующие АТ к штамму А/17/утка/Потсдам/86/92(Н5N2)			АТ к НА штамма А/17/утка/Потсдам/86/92(Н5N2)		
		титр до вакцинации Me (Q1;Q3) log <sub>2</sub>	титр после ре-вакцинации Me (Q1;Q3) log <sub>2</sub>	количество (%) 4-кратного прироста титров и более	титр до вакцинации Me (Q1;Q3) log <sub>2</sub>	титр после ре-вакцинации Me (Q1;Q3) log <sub>2</sub>	количество (%) 2-кратного прироста титров и более
Вакцина: 6,9 Ig ЭИД <sub>50</sub> /0,5 мл	18	2,3 <sup>1</sup> (2,3; 2,3)	4,3 <sup>1</sup> (3,3; 4,3)	9 (50,0)	2,3 <sup>2</sup> (2,3; 3,4)	3,3 <sup>2</sup> (2,3; 6,7)	6 (33,3)
8,3 Ig ЭИД <sub>50</sub> /0,5 мл	41	2,3 <sup>3</sup> (2,3; 2,3)	3,3 <sup>3</sup> (2,3; 4,3)	13 (31,7)	2,8 <sup>4</sup> (2,3; 6,2)	4,1 <sup>4</sup> (2,3; 6,3)	8 (19,5)
Плацебо	7	2,3 <sup>5</sup> (2,3; 3,3)	2,3 <sup>5</sup> (2,3; 3,3)	0 (0)	3,3 <sup>6</sup> (2,3; 7,1)	2,9 <sup>6</sup> (2,3; 6,6)	0 (0)

Примечание. <sup>1</sup> –  $p = 0,001$  (тест Уилкоксона:  $T = 0$ ;  $Z = 3,2958$ ); <sup>2</sup> –  $p = 0,016$  (тест Уилкоксона:  $T = 6$ ;  $Z = 2,4006$ ); <sup>3</sup> –  $p < 0,0001$  (тест Уилкоксона:  $T = 0$ ;  $Z = 4,5407$ ); <sup>4</sup> –  $p = 0,0005$  (тест Уилкоксона:  $T = 49$ ;  $Z = 3,5068$ ); <sup>5</sup> –  $p = 0,18$  (тест Уилкоксона:  $T = 0$ ;  $Z = 1,3416$ ); <sup>6</sup> –  $p = 0,07$  (тест Уилкоксона:  $T = 0$ ;  $Z = 1,8257$ ).

отметили изменений соответствующих серологических показателей.

Совпадение результатов двух тестов (РН и твердофазная РИНА) в плане выявления или не выявления сероконверсий в одних и тех же парах сывороток крови вакцинированных добровольцев составило 73,2%, при этом у 19,5% обследованных достоверный прирост уровня сывороточных АТ выявляли только в РН, а 7,3% привитых лиц демонстрировали иммунный ответ исключительно к НА вакцинного штамма. Достигнутый уровень значимости ( $p = 0,084$ ;  $n = 41$ ) при применении двустороннего варианта точного критерия Фишера, несмотря на его близость критическому значению, не позволил отвергнуть нулевую гипотезу об отсутствии статистической взаимосвязи между сероконверсиями к двум поверхностным гликопротеинам вируса. Однако при расширенном статистическом анализе все же выявили статистическую взаимосвязь средней силы между достоверными приростами титров сывороточных нейтрализующих и антинейраминидазных АТ (критерий V Крамера = 0,33;  $p = 0,04$ ); вероятность обнаружения сероконверсий антинейраминидазных АТ оказалась статистически значимо (в 3,59 (95% ДИ: 1,01–12,8) раза) выше у лиц с достоверным приростом уровня нейтрализующих АТ, чем у тех, кто его не имел. Отметим, что статистическая взаимосвязь между сероконверсиями антигемагглютинирующих и антинейраминидазных АТ к вакцинному штамму отсутствовала ( $p = 1$ ;  $n = 41$ ; данные не показаны).

Далее привитых добровольцев, участвовавших во второй стадии клинических испытаний моновалентной А(Н5N2), разделили на подгруппы на основании допрививочного титра АТ к НА вакцинного штамма: с титром, превышающим значение 1:20 ( $n = 15$ ), и с низким уровнем антинейраминидазных АТ ( $n = 26$ ). Формирование АТ к НА вируса гриппа в ответ на двукратное интраназальное введение ЖГВ А(Н5N2) в зависимости от исходного иммунологического статуса прививаемых представлено на рис. 2. Статистически значимое увеличение титра сывороточных антинейраминидазных АТ через 3 нед после ревакцинации наблюдали у исходно серонегативных лиц (выборочная статистика критерия Уилкоксона и достигнутый уровень значимости составили  $T = 1$ ;  $Z = 3,1099$ ;  $p = 0,002$ ), но не у волонтеров, имеющих фон АТ к НА штамма А/Ленинград/134/17/57(Н2N2) в титрах, значения которых варьировали от 1:30 до 1:420 ( $T = 33$ ;  $Z = 1,5335$ ;  $p = 0,13$ ). Достоверный прирост уровня антинейраминидазных АТ в ответ на двукратную прививку выявили у 23,1% серонегативных и 13,3% серопозитивных лиц, хотя точный критерий Фишера не подтвердил статистической взаимосвязи между частотой сероконверсий и исходным иммунологическим статусом у волонтеров согласно твердофазной РИНА с реассортантом RN2/57-human А(Н7N2) ( $p = 0,69$ ). Расхождение

суждений, выносимых о наличии обратной зависимости интенсивности АТ ообразования от исходного уровня иммуноглобулинов, специфичных к НА, на основании критериев Уилкоксона и Фишера, объясняется огрублением данных при переходе от шкалы отношений (титр АТ) к менее мощной номинальной шкале (отсутствие/наличие сероконверсии).

Таким образом, результаты проведенных клинических испытаний показали, что двукратная прививка моновалентной ЖГВ подтипа А(Н5N2) активно стимулировала выработку АТ не только к НА, но и к НА вакцинного штамма. Имела место обратная зависимость интенсивности антителиобразования к НА аттенуированного вируса от исходного уровня иммуноглобулинов указанной специфичности. Обнаружили статистическую взаимосвязь между сероконверсиями, выявленными в твердофазной РИНА и РН, т.е. антинейраминидазных и нейтрализующих АТ.

## Обсуждение

ВОЗ продолжает рекомендовать разработку самого широкого спектра противопандемических мер, включающих и разработку вакцин против различных антигенных вариантов высокопатогенных вирусов гриппа А(Н5N1) [11], циркулирующих среди диких и домашних птиц и вызывающих периодические вспышки заболевания у людей с высокой смертностью – до 60%. Текущее исследование было посвящено всесторонней оценке иммуногенности прототипа пандемической ЖГВ подтипа Н5 на основе штамма А/17/утка/Потсдам/86/92(Н5N2) в клинических испытаниях.

Двукратная прививка различными дозами моновалентной ЖГВ подтипа А(Н5N2) не только активно стимулировала выработку сывороточных нейтрализующих АТ, но и привела к статистически значимому увеличению титров АТ к НА вакцинного штамма с 19,5–33,3% сероконверсий. Различия в частоте достоверного прироста уровня антинейраминидазных АТ для двух этапов клинических испытаний отражали различия в проценте сероконверсий нейтрализующих АТ. Отчасти их можно объяснить неоднородностью иммунологического фона групп вакцинированных волонтеров по данным твердофазной РИНА с образцами сывороток крови, взятыми до прививки, а также обратной зависимостью интенсивности АТ ообразования к НА вакцинного штамма от исходного уровня иммуноглобулинов указанной специфичности, проявившейся при отсутствии праймирования населения вирусами Н5. Показанная зависимость выраженности иммунного ответа к минорному поверхностному гликопротеину вируса гриппа от специфики иммунологического фона в прививаемой группе лиц согласовывается с данными других исследователей [12] и должна учитываться при разработке тактики вакцинации.

Ранее в наших исследованиях было показано отсутствие

взаимосвязи между приростом уровня антигемагглютинирующих АТ и приростом содержания АТ к NA N1, выявляемыми с помощью твердофазной РИНА [5]. В текущем исследовании выявили статистическую взаимосвязь средней силы между сероконверсиями нейтрализующих и антинейраминидазных АТ; вероятность обнаружения сероконверсий в твердофазной РИНА оказалась несколько выше у лиц с достоверным приростом титров нейтрализующих АТ, чем у тех, кто его не имел. Этот факт находит объяснение в более широком спектре иммуноглобулинов (куда входят и антинейраминидазные АТ), способных наряду со штаммоспецифическими АТ к главному поверхностному антигену вируса внести вклад в наблюдаемый эффект нейтрализации репродукции инфекционного агента в культуре клеток. Тем не менее сочетанное применение РИ и твердофазной РИНА более полно характеризует иммунологические изменения в организме привитых.

Следует отметить, что аминокислотная последовательность N2 штамма А/Ленинград/134/57(H2N2), выделенного вскоре после внедрения вирусов подтипа А(H2N2) в человеческую популяцию, на 95% была гомологична NA вирусов гриппа птиц А(H5N2) и на 16–17% отличалась по первичной структуре от NA эпидемических изолятов подтипа А(H3N2), циркулировавших в 2009–2011 гг. Несмотря на то что NA аттенуированного вируса А(H5N2) унаследована от холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2), 1/3 участвовавших в клинических испытаниях волонтеров в возрасте 18–60 лет исходно имели высокие титры антинейраминидазных АТ к вакцинному штамму. Не обладая детальной информацией о возрасте волонтеров, участвовавших во второй фазе клинических испытаний, мы не можем с уверенностью утверждать, какой именно фактор: возможность контакта со штаммами подтипа А(H2N2) в период их циркуляции до 1968 г. или множественность инфекций пришедшими им на смену вирусами гриппа А(H3N2), играл ключевую роль в формировании АТ указанной специфичности. Тем не менее наблюдаемый иммунологический фон может послужить защитой от гриппозной инфекции при возможном возврате в циркуляцию вирусов гриппа подтипа А(H2N2), АТ к основному антигену которых – НА – у большинства населения отсутствуют. Защитная эффективность антинейраминидазных АТ в условиях смены подтипа НА уже была показана ранее в исследованиях A. Monto и соавт. [4].

Таким образом, в текущем исследовании разработана и апробирована методика оценки уровня сывороточных АТ к NA подтипа N2 вируса гриппа. Реассортантный штамм RN2/57-human A(H7N2), не обладая актуальной N2, тем не менее может быть полезен для более полной оценки праймирующего эффекта аттенуированных штаммов, разрабатываемых против потенциально пандемического гриппа. Показана необходимость учитывать содержание сывороточных антинейраминидазных АТ при разработке тактики вакцинации и оценке эффективности прививочной кампании с точки зрения формирования полноценного и сбалансированного иммунного ответа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bright R.A., Neuzil K.M., Pervikov Y., Palkonyay L. WHO meeting on the role of neuraminidase in inducing protective immunity against influenza infection. *Vaccine*. 2009; 27: 6366–9.
2. Найхин А.Н., Царицына И.М., Олейникова Е.В., Исмагулов А.Т., Резник В.И., Зырина Т.В. и др. Формирование и защитные функции АТ к нейраминидазе вируса гриппа А. *Вопросы вирусологии*. 1985; 30 (1): 35–9.
3. Найхин А.Н., Царицына И.М., Сыродоева Л.Г., Олейникова Е.В., Горев Н.Е., Зырина Т.В. и др. Антинейраминидазные сывороточные АТ а при естественном инфицировании гриппом А и имму-

- низации гриппозными вакцинами. *Вопросы вирусологии*. 1983; 28 (2): 154–09.
4. Monto A.S., Kendal A.P. Effect of neuraminidase antibody on Hong Kong influenza. *Lancet*. 1973; 301 (7804): 623–5.
5. Desheva Y., Smolonogina T., Rudenko L. Detection of anti-neuraminidase antibody in preclinical and clinical studies of live influenza vaccine. *Influenza Other Respir. viruses*. 2011; 5 (Suppl. 1): 370–2.
6. Rudenko L., Desheva J., Korovkin S., Mironov A., Rekstin A., Grigorieva E. et al. Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant vaccine (phase I–II clinical trials). *Influenza Other Respir. Viruses*. 2008; 2 (6): 203–9.
7. Дешева Ю.А., Руденко Л.Г., Александрова Г.И. Штамм вируса гриппа ГКВ 2389 для получения живой и инактивированной гриппозной вакцины. Патент № 2318871 РФ; 2008.
8. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J., Thompson W.W., Lu X., Lim W. et al. 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.
9. Lambré C.R., Terzidis H., Greffard A., Webster R.G. Measurement of anti-influenza neuraminidase antibody using a peroxidase-linked lectin and microtitre plates coated with natural substrates. *J. Immunol. Methods*. 1990; 135: 49–57.
10. Cate T.R., Rayford Y., Nino D., Winokur P., Brady R., Belshe R. et al. A high dosage influenza vaccine induced significantly more neuraminidase antibody than standard vaccine among elderly subjects. *Vaccine*. 2010; 28 (9): 2076–9.
11. World Health Organization. Summary of status of development and availability of A(H5N1) candidate vaccine viruses and potency testing reagents. URL: [http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/candidates\\_reagents/a\\_h5n1/en/](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/candidates_reagents/a_h5n1/en/) (accessed 24 January 2013).
12. Иванова В.Т., Слепушкин А.Н., Бурцева Е.И., Баландин Д.И., Варечкова Э., Руденко Л.Г. и др. Использование лектин-теста для выявления антинейраминидазных АТ в сыворотках вакцинированных. *Вопросы вирусологии*. 1991; 36 (6): 469–71.

#### REFERENCES

1. Bright R.A., Neuzil K.M., Pervikov Y., Palkonyay L. WHO meeting on the role of neuraminidase in inducing protective immunity against influenza infection. *Vaccine*. 2009; 27: 6366–9.
2. Naikhin A.N., Tsaritsyna I.M., Oleinikova E.V., Ismagulov A.T., Reznik V.I. et al. Formation and protective functions of antibodies to neuraminidase of the influenza A virus. *Voprosy Virusologii*. 1985; 30 (1): 35–9 (in Russian).
3. Naikhin A.N., Tsaritsyna I.M., Syrodоеva L.G., Oleinikova E.V., Gor-ev N.E. et al. Antineuraminidase serum antibodies in natural influenza A and immunization with influenza vaccines. *Voprosy Virusologii*. 1983; 28 (2): 154–9 (in Russian).
4. Monto A.S., Kendal A.P. Effect of neuraminidase antibody on Hong Kong influenza. *Lancet*. 1973; 301 (7804): 623–5.
5. Desheva Y., Smolonogina T., Rudenko L. Detection of anti-neuraminidase antibody in preclinical and clinical studies of live influenza vaccine. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2011; 5 (Suppl. 1): 370–2.
6. Rudenko L., Desheva J., Korovkin S., Mironov A., Rekstin A., Grigorieva E. et al. Safety and immunogenicity of live attenuated influenza reassortant vaccine (phase I–II clinical trials). *Influenza Other Respir. Viruses*. 2008; 2 (6): 203–9.
7. Desheva J.A., Rudenko L.G., Aleksandrova G.I. Strain of influenza virus GKV 2389 for production of living intranasal and inactivated influenza vaccine. Patent № 2318871 RF; 2008 (in Russian).
8. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J., Thompson W.W., Lu X., Lim W. et al. 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.
9. Lambré C.R., Terzidis H., Greffard A., Webster R.G. Measurement of anti-influenza neuraminidase antibody using a peroxidase-linked lectin and microtitre plates coated with natural substrates. *J. Immunol. Methods*. 1990; 135: 49–57.
10. Cate T.R., Rayford Y., Nino D., Winokur P., Brady R., Belshe R. et al. A high dosage influenza vaccine induced significantly more neuraminidase antibody than standard vaccine among elderly subjects. *Vaccine*. 2010; 28 (9): 2076–9.
11. World Health Organization. Summary of status of development and availability of A(H5N1) candidate vaccine viruses and potency testing reagents. URL: [http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/candidates\\_reagents/a\\_h5n1/en/](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/candidates_reagents/a_h5n1/en/) (accessed 24 January 2013).
12. Ivanova V.T., Slepushkin A.N., Burtseva E.I., Balandin D.I., Varecková E., Rudenko L.G. et al. The use of the lectin test for detecting antineuraminidase antibodies in the sera of vaccinated subjects. *Voprosy Virusologii* 1991; 36 (6): 469–71 (in Russian).

Поступила 29.12.12