

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-183>

Формирование специфического иммунитета у лабораторных животных после одновременной вакцинации против сезонного гриппа и COVID-19

Игнатъев Г.М.¹, Ленева И.А.², Отрашевская Е.В.³, Козловская Л.И.¹,
Карташова Н.П.², Федякина И.Т.², Шустова Е.Ю.¹, Синюгина А.А.¹,
Зверев В.В.⁴, Трухин В.П.³, Ишмухаметов А.А.¹

¹Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

²НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Аннотация

Введение. Клиническая дифференциальная диагностика COVID-19 может быть затруднительна в случае совпадения с сезоном гриппа, что, в свою очередь, может приводить к несвоевременности принятия необходимых мер для борьбы с пандемией SARS-CoV-2. Существует также проблема сопутствующего SARS-CoV-2 инфицирования вирусом гриппа (ВГ), что значительно утяжеляет течение COVID-19.

Целью настоящей работы было изучение взаимного влияния одновременной иммунизации отечественными вакцинами для профилактики гриппа и COVID-19 на формирование специфического иммунитета лабораторных животных.

Материалы и методы. В исследовании использовали мышей линии BALB/c. Иммунизацию животных проводили внутримышечно вакциной для профилактики COVID-19 (КовиВак) и вакциной для профилактики гриппа (Флю-М). Сыворотки иммунизированных животных исследовали индивидуально. Реакцию торможения гемагглютинации проводили с тремя штаммами ВГ. Антитела (АТ) к SARS-CoV-2 определяли при помощи иммуноферментного анализа. Для выявления вируснейтрализующих АТ к SARS-CoV-2 и к ВГ проводили реакцию нейтрализации.

Результаты. Обнаружены достаточно высокие титры специфических АТ в группах животных, привитых как одной, так и двумя вакцинами одновременно. В группах животных, привитых КовиВак и двумя вакцинами одновременно, как в иммуноферментном анализе, так и в реакции нейтрализации средние показатели специфических АТ к SARS-CoV-2 статистически не различались. В группе животных, привитых одновременно двумя вакцинами, обнаружены статистически более высокие титры АТ к ВГ после второй иммунизации относительно группы животных, привитых Флю-М.

Обсуждение. Продемонстрировано формирование поствакцинального иммунитета как к ВГ, так и к SARS-CoV-2 после одновременной иммунизации двумя вакцинами. Обнаруженное усиление поствакцинального иммунного ответа к ВГ у лабораторных животных, привитых двумя вакцинами одновременно, требует дальнейшего изучения.

Заключение. Проведённые исследования позволяют предположить возможность одновременной вакцинации для профилактики гриппа и COVID-19.

Ключевые слова: грипп, SARS-CoV-2, одновременная вакцинация

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Вакцина КовиВак предоставлена организацией-разработчиком, занимающейся её распространением. В число авторов статьи входят сотрудники и генеральный директор данной организации. Вакцина Флю-М предоставлена организацией-разработчиком, занимающейся её распространением. В число авторов статьи входят сотрудники и директор данной организации.

Для цитирования: Игнатъев Г.М., Ленева И.А., Отрашевская Е.В., Козловская Л.И., Карташова Н.П., Федякина И.Т., Шустова Е.Ю., Синюгина А.А., Зверев В.В., Трухин В.П., Ишмухаметов А.А. Формирование специфического иммунитета у лабораторных животных после одновременной вакцинации против сезонного гриппа и COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):648–656.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-183>

Development of specific immunity in laboratory animals after co-immunization against seasonal influenza and COVID-19

Georgy M. Ignatyev^{1✉}, Irina A. Leneva², Alena V. Atrasheuskaya³, Liubov I. Kozlovskaya¹, Nadezhda P. Kartashova², Irina T. Fediakina², Elena Yu. Shustova¹, Aleksandra A. Sinyugina¹, Vitaly V. Zverev⁴, Victor P. Trukhin³, Aidar A. Ishmukhametov¹

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

³Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Saint Petersburg, Russia;

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract

Introduction. In clinical practice, the differential diagnosis of COVID-19 can be challenging during the flu season, entailing serious consequences such as delays in appropriate control measures against the SARS-CoV-2 pandemic. Another problem is posed by co-infection of SARS-CoV-2 and influenza virus (IV), which significantly contributes to the severity of the COVID-19 disease.

This study was aimed to explore the cross-impact of co-administration of Russian influenza and COVID-19 vaccines on development of specific immunity in laboratory animals.

Materials and methods. The study was conducted on BALB/c mice. The animals were inoculated intramuscularly with the vaccine for COVID-19 prevention (CoviVac) and the vaccine for influenza prevention (Flu-M). The sera from the immunized animals were examined separately. Three IV strains were used in the hemagglutination inhibition assay. Antibodies (Abs) against SARS-CoV-2 were detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The neutralization test was performed to detect virus neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and IV.

Results. Relatively high titers of specific Abs were found in the groups of animals inoculated with one vaccine and with two vaccines concurrently. In the groups of animals inoculated with CoviVac and with two vaccines concurrently, both in the ELISA test and in the neutralization test, the average titers of specific Abs against SARS-CoV-2 did not demonstrate any statistical difference. The group of animals inoculated concurrently with two vaccines demonstrated statistically higher titers of Abs against IV after the second immunization compared to the group of animals inoculated with Flu-M.

Discussion. The study has shown that post-vaccination immunity both to IV and to SARS-CoV-2 develops after co-vaccination with two vaccines. The observed enhanced post-vaccination immune response to IV in the co-immunized laboratory animals needs further research.

Conclusion. The performed studies suggest the possibility of co-administration of two vaccines to prevent influenza and COVID-19.

Keywords: *influenza, SARS-CoV-2, co-vaccination*

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The CoviVac vaccine was provided by the development and distribution organization. The authors of the article include employees and the general director of this organization. The Flu-M vaccine was provided by the development and distribution organization. The authors of the article include employees and the director of the organization.

For citation: Ignatyev G.M., Leneva I.V., Atrasheuskaya A.V., Kozlovskaya L.I., Kartashova N.P., Fediakina I.T., Shustova E.Yu., Sinyugina A.A., Zverev V.V., Trukhin V.P., Ishmukhametov A.A. Development of specific immunity in laboratory animals after co-immunization against seasonal influenza and COVID-19. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):648–656. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-183>

Введение

Грипп и COVID-19 представляют собой респираторные вирусные заболевания, которые могут быть клинически неотличимы и, как правило, опасны для жизни в основном одних и тех же групп населения — пожилых людей и людей, страдающих хроническими заболеваниями. Симпто-

мы COVID-19 в большинстве случаев протекают легко и напоминают простуду. Поскольку и грипп, и COVID-19 — респираторные вирусные заболевания, их пик активности может приходиться на один и тот же период года — зимние месяцы в странах с умеренным климатом. В случае совпадения с сезоном гриппа клиническая дифференциальная ди-

агностика гриппа и COVID-19 может быть затруднительна, что, в свою очередь, может приводить к несвоевременности принятия необходимых мер для борьбы с пандемией SARS-CoV-2 [1].

Во время продолжающейся или рецидивирующей циркуляции SARS-CoV-2 одновременно с вирусом гриппа (ВГ) в осенне-зимний сезон вакцинация против гриппа может снизить как распространённость самого гриппа, так и количество случаев с симптомами, которые можно спутать с симптомами COVID-19. Предотвращение и снижение тяжести симптомов гриппа, уменьшение количества амбулаторных гриппоподобных заболеваний в целом, количества госпитализаций и реанимационных мероприятий за счёт вакцинации против гриппа также может снизить нагрузку на систему здравоохранения [1, 2]. Следует также отметить, что диагностические тесты, а также человеческие ресурсы ограничены. Неполная и несвоевременная диагностика, в том числе дифференциальная, будет значительно воздействовать на работу системы здравоохранения в плане принятия адекватных противоэпидемических мер и создавать напряжённость в работе лечебных учреждений, а также повышать вероятность внутрибольничной передачи инфекции.

Исходя из приведённых выше соображений, большинство медицинских работников выступают за расширение программ вакцинации против гриппа, т.к. увеличение охвата населения вакцинацией против сезонного гриппа может помочь организации диагностических и лечебных мероприятий в период продолжающейся пандемии SARS-CoV-2, позволив упростить дифференциальную диагностику, а также снизить нагрузку как на систему здравоохранения в целом, так и на отделения интенсивной терапии в частности [1, 3]. Так, например, в 2002 г. во время вспышки «тяжёлого острого респираторного синдрома», вызванного SARS-CoV-1, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендовала активизировать кампанию по вакцинации против гриппа, ориентированную на группы риска, чтобы иметь возможность быстро дифференцировать эти инфекции и принимать более точные и эффективные меры противодействия [4]. Руководство Центра по контролю и профилактике заболеваний США в период пандемии SARS-CoV-2 настоятельно рекомендует медицинским работникам использовать любую возможность для проведения вакцинации против гриппа до начала сезона [5].

Однако некоторое время в научном сообществе и в средствах массовой информации велись дискуссии по поводу взаимосвязи между вакцинацией против гриппа и COVID-19. Исследование, проведённое G.G. Wolff, «выявило» повышенный риск заболевания коронавирусом у лиц, вакцинированных против гриппа [6]. Он предположил, что вакцинация против гриппа снижает вероятность зараже-

ния гриппом, но при этом отсутствует стимуляция ВГ врождённого иммунитета, что и повышает, в итоге, риск заболевания COVID-19. Исследования G.G. Wolff, и в особенности его неожиданные выводы, привели не только к активному обсуждению, но и к исследованию данного «феномена». Ретроспективный статистический анализ взаимосвязи между вакцинацией против гриппа и другими респираторными, в том числе коронавирусными, заболеваниями сезонов 2010–2011 гг. и 2016–2017 гг. в Канаде [7], а также сезона COVID 2019/2020 в Италии [8] опровергли выводы, сделанные G.G. Wolff. Также было продемонстрировано отсутствие связи между вакцинацией против гриппа и COVID-19 в исследовании, в котором изучались связи между вакцинацией против гриппа и заболеваемостью SARS-CoV-2 у медицинских работников [5]. Более того, M.D. Ricció и соавт., проведя системный анализ опубликованных данных, обнаружили обратную зависимость, которая была несколько неожиданной, учитывая, что гриппозные вакцины не предназначены для защиты от SARS-CoV-2 [3].

Китайскими и канадскими учёными путём математического моделирования была протестирована гипотеза о том, что кампания массовой вакцинации против гриппа будет иметь положительное влияние на организацию медицинской помощи и результаты лечения пациентов с неспецифическими симптомами и гриппоподобными жалобами с риском развития COVID-19 или других респираторных инфекций. Результаты показали, что увеличение уровня охвата вакцинацией против гриппа до оптимального порога задолго до начала сезона будет способствовать усилиям по сдерживанию вспышки COVID-19 в плане быстрой постановки диагноза и принятия адекватных противоэпидемических мер [1].

Многие авторы сходятся во мнении, что исследования зависимости заболеваемости COVID-19 от вакцинации против сезонного гриппа следует продолжать, чтобы подтвердить предварительные выводы и изучить их валидность в отношении различных групп населения [3, 5, 8].

Существует ещё одна проблема, которая также требует исследования оценки влияния вакцинации против гриппа в период не только пандемии COVID-19, но и в последующие периоды. Проведённый китайскими учёными метаанализ опубликованных данных показал, что распространённость коинфекции у пациентов с COVID-19 варьировала в разных исследованиях, однако могла достигать 50% среди летальных случаев. Сопутствующие патогены включали как бактерии, так и вирусы. Вирус гриппа А был одним из наиболее распространённых среди вирусов, которые сопутствовали коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 [9, 10]. Проведённые экспериментальные работы по одновременному заражению хорьков ВГ, штамм А1N1, и вирусом

SARS-CoV-2 продемонстрировали значительное утяжеление инфекционного процесса и увеличение смертности [11].

Также было обнаружено, что сопутствующее инфицирование ВГ также может приводить к ложноотрицательному результату на rRT-PCR, особенно при тяжёлой форме острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 [9]. Диагностирование инфекции SARS-CoV-2 важно, поскольку позволяет принимать необходимые меры эпидемиологического контроля и использовать эффективную противовирусную терапию в отношении SARS-CoV-2.

Таким образом, сложно переоценить значимость мероприятий по вакцинации населения против сезонного гриппа в период пандемии COVID-19. Максимальный уровень охвата вакцинацией против сезонного гриппа позволит упростить диагностику и уменьшить вероятность коинфекции ВГ в период пандемии SARS-CoV-2-инфекции.

Целью настоящей работы было изучение взаимного влияния вакцин для профилактики гриппа и SARS-CoV-2 российского производства на формирование специфического поствакцинального иммунитета при одновременном введении лабораторным животным.

Материалы и методы

В исследовании использовали мышей линии BALB/c (гаплотип H-2^d) обоего пола массой 16–18 г. Животные были получены из питомника «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА.

В исследовании использовали зарегистрированные на территории России вакцину для профилактики гриппа трёхвалентную инактивированную (Флю-М; СпбНИИВС ФМБА России), содержащую антигены ВГ типа А (H1N1, H3N2) и типа В; и вакцину для профилактики COVID-19 инактивированную, цельновирионную (КовиВак; ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН). В качестве контроля была использована «Вода для инъекций» («Микроген»).

Животные были разделены на группы по 20 мышей. Иммунизацию животных проводили внутримышечно (бедренная мышца) в дозах, рекомендованных производителями соответствующих вакцин. Животных вакцинировали препаратами КовиВак и/или Флю-М дважды с интервалом 14 сут для проведения сравнительных исследований иммунного ответа и оценки взаимного влияния препаратов при одновременном введении. При иммунизации двумя препаратами их вводили в разные конечности. Животным из группы контроля на 0-е и 14-е сутки эксперимента вводили воду для инъекций в объёме 0,5 мл.

У животных всех групп перед проведением 1-й (на 0-е сутки) и 2-й иммунизации (на 14-е сутки), а также на 28-е сутки эксперимента (14-е сутки

после 2-й иммунизации) производили забор крови из глазной вены. Образцы крови после центрифугирования разливали по пробиркам и хранили при –70°C для последующего одномоментного исследования. Специфические антитела (АТ) у иммунизированных животных определяли индивидуально в сыворотке крови каждого животного.

Все процедуры на отдельных мышах проводили в соответствии с Международными принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» ETS № 123 (Страсбург, 1986), Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили в соответствии с протоколом ВОЗ [12] по ранее описанной методике [13] с тремя штаммами ВГ: А/H1N1 (Guangdong-Maonan/SWL1536/2019), А/H3N2 (Hong Kong/2671/2019), В (Washington/02/2019) из рабочей коллекции вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова. Для статистической обработки полученные титры специфических АТ переводили в \log_{10} (lg), отрицательный результат (РТГА ≤ 10) приравнивали к 1 lg.

Имуноферментный анализ (ИФА) для выявления АТ к SARS-CoV-2 проводили с использованием тест-системы для определения IgG к протеинам N и S (subunit S2) вируса SARS-CoV-2 для лабораторного применения («НПФ Литех») в соответствии с инструкцией разработчика. Для статистической обработки полученный результат переводили в \log_{10} (lg), отрицательный результат (ИФА ≤ 100) приравнивали к 1 lg.

Реакцию нейтрализации (РН) для определения вируснейтрализующих АТ к SARS-CoV-2 проводили с использованием штамма PIK35 SARS-CoV-2 из рабочей коллекции вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН. Перед проведением анализа готовили двукратные разведения образцов сывороток животных с использованием среды DMEM (ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН). Разведения сывороток смешивали с равными объёмами вирусной суспензии, содержащей 50 ТЦИД₅₀ на лунку. После 1 ч инкубации при 37°C смесь вирус + сыворотка вносили в монослой клеток Vero в 2 повторах. Параллельно контроль клеток Vero инкубировали с аналогичными разведениями неиммунной («–» контроль) и иммунной («+» контроль) мышинных сывороток (ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН). После 5-дневной инкубации при 37°C цитопатическое действие вируса оценивали с помощью светового микроскопа. Титр нейтрализующих АТ рассчитывали согласно методу G. Kärber¹.

¹ Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Archiv f experimentel Pathol u Pharmakol. 1931; 162: 480–483. DOI: 10.1007/BF01863914.

Для статистической обработки полученный результат переводили в \log_2 , отрицательный результат ($PH \leq 2$) приравнивали к $1 \log_2$.

РН для определения нейтрализующих АТ к ВГ проводили по ранее описанной методике [13] с 3 штаммами ВГ: А/Н1N1 (Guangdong-Maonan/SWL1536/2019), А/Н3N2 (Hong Kong/2671/2019), В (Washington/02/2019) из рабочей коллекции вирусов НИИВС им. И.И. Мечникова. Для дальнейшей статистической обработки полученные титры специфических АТ переводили в Ig, отрицательный результат ($PH \leq 20$) приравнивали к $1 \log_2$.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016». Данные титров специфических АТ по группам животных представлены в виде среднего геометрического (GMT) значения и стандартного отклонения среднего (SD). Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента, парного, с двумя хвостами распределения. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляцию между вируснейтрализующими АТ с соответствующими специфическими АТ в РТГА и в ИФА оценивали с помощью коэффициента Пирсона (*r*).

Результаты

Все животные до иммунизации не имели определяемых уровней специфических АТ ни в одном их проводимых тестах.

Формирование соответствующего специфического поствакцинального иммунитета было отмечено во всех группах животных, кроме контрольной. У животных контрольной группы специфические АТ не были обнаружены ни в одном из тестов, ни на одной из точек забора крови. За время наблюдения не погибло ни одно животное.

В РТГА отмечено формирование специфического иммунитета к 3 штаммам ВГ у животных, по-

лучивших Флю-М и Флю-М + КовиВак (табл. 1). Через 14 сут после 1-й иммунизации разница между этими группами по уровню АТ к ВГ была статистически недостоверной ($p = 0,08-0,16$). При сравнении уровня специфических АТ к ВГ после 1-й и 2-й иммунизации в обеих группах выявлено статистически достоверное увеличение уровня АТ ко всем штаммам ВГ, кроме штамма А/Н3N2 в группе животных, привитых Флю-М. Следует отметить, что после 1-й иммунизации уровень АТ к штамму ВГ А/Н3N2 был достоверно выше, чем уровни АТ к двум другим штаммам ВГ, в обеих группах ($p < 0,0005$). После 2-й иммунизации внутри обеих групп животных титры АТ к штаммам ВГ типа А практически не различались; а АТ к штамму В были достоверно ниже ($p < 0,05$). После 2-й иммунизации уровни специфических АТ в РТГА были достоверно выше у животных, получивших Флю-М + КовиВак, относительно группы животных, привитых только Флю-М ($p = 0,0001-0,002$). В группе животных, иммунизированных КовиВак, АТ к ВГ не определялись ни на одной из контрольных точек.

В результате иммунизации животных отмечено формирование вируснейтрализующих АТ к 3 штаммам ВГ в группах, получивших Флю-М и Флю-М + КовиВак (табл. 2). После 1-й иммунизации разница в уровнях вируснейтрализующих АТ к ВГ между группами была статистически недостоверна ($p = 0,10-0,99$). В динамике при сравнении уровня вируснейтрализующих АТ к ВГ у животных этих групп выявлено статистически достоверное увеличение уровня АТ ко всем штаммам ВГ, кроме штамма А/Н3N2, в группе животных, привитых Флю-М. Данный результат соответствует результатам, полученным в РТГА (табл. 1). Следует отметить, что после 1-й иммунизации уровень вируснейтрализующих АТ к штамму А/Н3N2 был достоверно выше, чем уровни АТ к двум другим штаммам ВГ, в обеих группах ($p < 0,05$). После 2-й иммунизации обнаружена статистически достовер-

Таблица 1. Уровень специфических АТ (Ig) к ВГ в РТГА у лабораторных животных после иммунизации Флю-М и КовиВак (GMT \pm SD)

Table 1. Levels of specific Abs (Ig) against IV in HIA in laboratory animals after immunization with Flu-M and CoviVac (GMT \pm SD)

День исследования Day of study	Флю-М Flu-M			Флю-М + КовиВак Flu-M + CoviVac			КовиВак CoviVac		
	Штамм ВГ / IV strain								
	А/Н1N1	А/Н3N2	В	А/Н1N1	А/Н3N2	В	А/Н1N1	А/Н3N2	В
14	1,38 \pm 0,20	1,80 \pm 0,20	1,25 \pm 0,22	1,59 \pm 0,38	1,98 \pm 0,30	1,41 \pm 0,35	H.o. N.d.	H.o. N.d.	H.o. N.d.
28	2,03 \pm 0,58	1,86 \pm 0,36	1,55 \pm 0,26	3,00 \pm 0,20	2,94 \pm 0,29	2,09 \pm 0,28	H.o. N.d.	H.o. N.d.	H.o. N.d.
<i>t</i> -test	0,0084	0,52177	0,01817	0,0009	0,0015	0,0039	–	–	–

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: Н.о. — не определялись, т.е. отсутствовали при проведении исследования.

Note. Here and in Tables 2, 3: N.d. — not detectable.

Таблица 2. Уровень вируснейтрализующих АТ к ВГ в РН (\log_2) у лабораторных животных после иммунизации Флю-М и КовиВак (GMT \pm SD)

Table 2. Levels of virus neutralizing Abs against IV in NT (\log_2) in laboratory animals after immunization with Flu-M and CoviVac (GMT \pm SD)

День исследования Day of study	Флю-М Flu-M			Флю-М + КовиВак Flu-M + CoviVac			КовиВак CoviVac		
	Штамм ВГ / IV strain								
	A/H1N1	A/H3N2	B	A/H1N1	A/H3N2	B	A/H1N1	A/H3N2	B
14	2,20 \pm 0,27	2,49 \pm 0,28	1,77 \pm 0,40	1,91 \pm 0,42	2,50 \pm 0,14	1,71 \pm 0,58	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.
28	2,69 \pm 0,38	2,52 \pm 0,27	2,17 \pm 0,40	3,05 \pm 0,12	2,99 \pm 0,16	2,69 \pm 0,16	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.
t-test	0,0038	0,8104	0,0426	0,0001	0,0002	0,0038	–	–	–

ная разница между группами животных по уровню вируснейтрализующих АТ к ВГ ($p = 0,0002-0,002$). Уровни вируснейтрализующих АТ после 2-й иммунизации были достоверно выше в группе животных, привитых Флю-М + КовиВак, что также согласуется с результатами РТГА (табл. 1). В обеих группах животных АТ к штаммам ВГ типа А были практически на одном уровне; достоверно ниже были АТ к штамму ВГ типа В ($p < 0,05$). В группе животных, иммунизированных КовиВак, нейтрализующие АТ к 3 штаммам ВГ не определялись ни на одной из контрольных точек (табл. 2). При расчёте корреляции между уровнем АТ к ВГ в РТГА и уровнем вируснейтрализующих АТ к ВГ в обеих группах животных после 1-й и 2-й вакцинации коэффициент корреляции Пирсона колебался от 0,60 до 0,87. Данные значения коэффициента Пирсона соответствуют значимой степени корреляции с достоверностью $p < 0,05$.

В табл. 3 представлены титры специфических АТ к SARS-CoV-2 в ИФА и РН. В результате иммунизации животных отмечено формирование специфических АТ к SARS-CoV-2 в группах, получивших КовиВак и Флю-М + КовиВак. Через 14 дней после 1-й иммунизации разница между уровнями специфических АТ была статистически не достоверна между данными группами в ИФА ($p = 0,10$) и РН ($p = 0,09$). При сравнении показателей иммунитета

животных внутри групп после 1-й и 2-й иммунизации выявлено статистически достоверное увеличение уровня АТ в ИФА и РН (табл. 3). После 2-й иммунизации разница между уровнями специфических АТ к SARS-CoV-2 в ИФА и РН в группах животных, привитых КовиВак и Флю-М + КовиВак, была статистически недостоверна ($p \geq 0,10$). В группе животных, иммунизированных Флю-М, специфические АТ к вирусу SARS-CoV-2 не определялись ни на одной из контрольных точек. Коэффициент корреляции Пирсона между уровнем АТ к SARS-CoV-2 в ИФА и в РН составил 0,89–0,94 в обеих группах животных после 1-й и 2-й вакцинации. Данные значения коэффициента Пирсона соответствуют значимой степени корреляции с достоверностью $p < 0,01$.

Обсуждение

В результате эксперимента, предпринятого для оценки взаимного влияния иммунизации отечественными препаратами КовиВак и Флю-М, выявлено отсутствие негативного влияния как вакцины Флю-М на формирование иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, так и вакцины КовиВак на формирование иммунитета к ВГ при одновременном введении лабораторным животным.

Формирование иммунитета к ВГ выявлено в группах животных КовиВак и Флю-М + КовиВак,

Таблица 3. Уровень специфических АТ к SARS-CoV-2 в РН (\log_2) и ИФА (Ig) у лабораторных животных после иммунизации Флю-М и КовиВак (GMT \pm SD)

Table 3. Levels of specific Abs against SARS-CoV-2 in NT (\log_2) and ELISA (Ig) in the laboratory animals after the immunization with Flu-M and CoviVac (GMT \pm SD)

День исследования Day of study	Флю-М Flu-M		Флю-М + КовиВак Flu-M + CoviVac		КовиВак CoviVac	
	РН / NA	ИФА / ELISA	РН / NA	ИФА / ELISA	РН / NA	ИФА / ELISA
14	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.	2,53 \pm 1,66	2,53 \pm 1,66	2,53 \pm 1,66	1,90 \pm 0,75
28	Н.о. N.d.	Н.о. N.d.	5,75 \pm 1,14	5,75 \pm 1,14	5,75 \pm 1,14	2,76 \pm 0,28
t-test	–	–	0,0029	0,0029	0,0029	0,0249

что подтверждается наличием специфических АТ в сыворотке крови животных, определённых как в РТГА, так и в РН. Средние показатели АТ к ВГ в обеих группах животных были на достаточно высоком уровне, аналогичном описанному ранее в эксперименте по двукратной вакцинации мышей BALB/c инактивированными отечественными вакцинами для профилактики гриппа [13]. Интересно, что после 1-й иммунизации разница в уровнях специфических АТ как в РТГА, так и в РН между группами, получившими КовиВак и Флю-М + КовиВак, практически отсутствовала. Однако после 2-й иммунизации выявлено очевидное преимущество одновременной иммунизации препаратами КовиВак и Флю-М, что подтверждается статистически достоверной разницей между средними показателями уровней специфических АТ к ВГ как в РТГА, так и в РН. Соотношение между уровнями специфических АТ к 3 штаммам ВГ сохранялось схожим как в динамике в пределах одной группы, так и между группами на соответствующих точках исследования. Уровень АТ к ВГ у обоих штаммов типа А был практически одинаковым и статистически более значим, чем уровень АТ к штамму типа В линии Victoria в обеих группах, как после 1-й, так и после 2-й иммунизации животных. Полученные в данном эксперименте данные сопоставимы с ранее опубликованными [13, 14].

Формирование поствакцинального иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 выявлено в группах животных, получивших КовиВак и Флю-М + КовиВак, что подтверждается наличием в сыворотке крови животных специфических АТ, определённых как в ИФА, так и в РН. Интересно, что после 1-й иммунизации кажущаяся разница в уровнях специфических АТ как в ИФА, так и в РН между группами, получившими КовиВак и Флю-М + КовиВак, оказалась статистически недостоверной. А после 2-й иммунизации разница в уровнях АТ как в ИФА, так и в РН между группами отсутствовала.

В результате проведённых исследований выявлено не только отсутствие негативного влияния на иммунитет при одновременной иммунизации вакцинами для профилактики гриппа и COVID-19, но, более того, обнаружено определённое усиливающее влияние на уровень специфических АТ к ВГ, что было несколько неожиданно. Данный феномен, являясь однозначно положительным, требует дальнейшего изучения для выяснения механизмов усиления иммунного ответа к ВГ. Вакцина КовиВак является инактивированной и цельновирионной и содержит гидроксид алюминия. Учитывая тот факт, что вакцины КовиВак и Флю-М вводились в разные конечности животного, можно предположить отсутствие адъювантного влияния гидроксида алюминия на формирование специфических АТ к ВГ.

Проведённый несколько ранее эксперимент с одновременной вакцинацией трансгенных мышей вакцинами для профилактики гриппа и COVID-19 продемонстрировал формирование нейтрализующих АТ как к ВГ, штамм A/H1N1, так и к вирусу SARS-CoV-2. Более того, был продемонстрирован протективный эффект при последующем заражении лабораторных животных ВГ и SARS-CoV-2 [11]. В эксперименте L. Bao и соавт. [11], как и в нашем исследовании, применяли инактивированную вакцину для профилактики COVID-19 («PiCoVacc», «Sinovac Biotech Ltd.») и инактивированную вакцину против гриппа («Anflu», «Sinovac Biotech Ltd.»). При сравнении уровней АТ к ВГ, штамм A/H1N1, отмечалась тенденция к более высокому уровню у группы животных, привитых одновременно двумя вакцинами, относительно группы животных, привитых только противогриппозной вакциной. В этом же исследовании изучалось соотношение субпопуляций Т-лимфоцитов CD4⁺/CD8⁺. При анализе баланса иммунного ответа субпопуляциями клеток Th1 и Th2, важного показателя формирования адаптивного иммунитета, определённое преимущество было у группы животных, привитых одновременно обеими вакцинами, которое подтверждалось повышенными уровнями интерлейкина-4 в сыворотке их крови [11]. В отличие от нашего исследования, группы животных были небольшими ($n = 6$); сами животные были трансгенными Tg (K18-hACE2) для изучения АТ-зависимого эффекта; иммунизация вакциной для профилактики гриппа была проведена однократно [11]. В нашем же исследовании мыши линии BALB/c были привиты дважды гриппозной вакциной, как было описано ранее [13].

Результаты, полученные в настоящем исследовании, подтверждают положительный эффект от одновременной иммунизации лабораторных животных отечественными вакцинами для профилактики гриппа Флю-М и для профилактики коронавирусной инфекции КовиВак, подтверждённый формированием специфических вируснейтрализующих АТ. Обнаруженное нами усиление иммунного ответа к ВГ у лабораторных животных при одновременной иммунизации является положительным результатом, однако требует дальнейшего изучения механизма её возникновения.

Заключение

В ситуации, когда, весьма вероятно, прививаться против COVID-19 надо будет с определённой периодичностью, необходимо планировать стратегию иммунизации, особенно пожилого населения страны, с учётом уже рекомендованных вакцин, как например, вакцин против пневмококка и гриппа. Своевременная вакцинация может предотвратить одновременное заражение и благоприятно повли-

ять на исход такого заболевания, как COVID-19. Международный Совет по иммунизации взрослого населения (ICAI), отметив высокий риск тяжёлого течения COVID-19 в результате коинфицирования и последующего, вслед за перенесённым COVID-19, инфицирования ВГ, призывает мировое сообщество и правительства расставить приоритеты и разработать отдельную программу иммунизации взрослого населения [15].

Результаты, полученные в настоящем исследовании, подтверждают формирование специфического поствакцинального иммунитета к ВГ и SARS-CoV-2 при одновременной иммунизации лабораторных животных отечественными вакцинами для профилактики гриппа Флю-М и для профилактики коронавирусной инфекции КовиВак. Проведённые лабораторные исследования позволяют предположить возможность, при необходимости, одновременной иммунизации взрослого населения страны вакцинами для профилактики гриппа и COVID-19.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

1. Li Q., Tang B., Bragazzi N.L., Xiao Y., Wu J. Modeling the impact of mass influenza vaccination and public health interventions on COVID-19 epidemics with limited detection capability. *Math. Biosci.* 2020; 325: 108378. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2020.108378>
2. Grohskopf L.A., Alyanak E., Broder K.R., Blanton L.H., Fry A.M., Jernigan D.B., et al. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the advisory committee on immunization practices – United States, 2020–21 Influenza Season. *MMWR Recomm. Rep.* 2020; 69(8): 1–24. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6908a1>
3. Del Riccio M., Lorini C., Bonaccorsi G., Paget J., Caini S. The association between influenza vaccination and the risk of SARS-CoV-2 infection, severe illness, and death: A systematic review of the literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020; 17(21): 7870. <https://doi.org/10.3390/ijerph17217870>
4. Schlegelhauf P. Influenza vaccine enlisted to prevent SARS confusion. *Lancet.* 2003; 362(9386): 809. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14301-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14301-2)
5. Belingheri M., Paladino M.E., Latocca R., De Vito G., Riva M.A. Association between seasonal flu vaccination and COVID-19 among healthcare workers. *Occup. Med. (Lond.)*. 2020; 70(9): 665–71. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqaa197>

Информация об авторах

Игнатъев Георгий Михайлович[✉] — д.м.н., профессор, зам. руководителя направления по качеству и инновационным разработкам ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, ignatjev_gm@chumakovs.su, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Ленева Ирина Анатольевна — д.б.н., зав. лаб. экспериментальной вирусологии Отдела вирусологии им. О.Г. Анжапаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Отрашевская Елена Викторовна — начальник отдела научных исследований и опытно-конструкторских работ СПбНИИВС, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Козловская Любовь Игоревна — к.б.н., в.н.с. ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3029-1035>

6. Wolff G.G. Influenza vaccination and respiratory virus interference among department of defense personnel during the 2017–2018 influenza season. *Vaccine.* 2020; 38(2): 350–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.005>
7. Cocco P., Meloni F., Coratza A., Schirru D., Campagna M., De Matteis S. Vaccination against seasonal influenza and socio-economic and environmental factors as determinants of the geographic variation of COVID-19 incidence and mortality in the Italian elderly. *Prev. Med.* 2021; 143: 106351. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2020.106351>
8. Skowronski D.M., Zou M., Clarke Q., Chambers C., Dickinson J.A., Sabaiduc S., et al. Influenza vaccine does not increase the risk of coronavirus or other noninfluenza respiratory viruses: retrospective analysis from Canada, 2010–2011 to 2016–2017. *CID.* 2020; 71(16): 2285–8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa626>
9. Lai C.C., Wang C.Y., Hsueh P.R. Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53(4): 505–12. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.05.013>
10. Stowe J., Tessier E., Zhao H., Guy R., Muller-Pebody B., Zambon M., et al. Interactions between SARS-CoV-2 and influenza, and the impact of coinfection on disease severity: a test-negative design. *Int. J. Epidemiol.* 2021; 50(4): 1124–33. <https://doi.org/10.1093/ije/dyab081>
11. Bao L., Deng W., Qi F., Lv Qi., Song Zh., Liu J., et al. Sequential infection with H1N1 and SARS-CoV-2 aggravated COVID-19 pathogenesis in a mammalian model, and co-vaccination as an effective method of prevention of COVID-19 and influenza. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021; 6(1): 200. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00618-z>
12. WHO. Global Influenza Surveillance Network. Manual for the Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza. Geneva; 2011. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf
13. Shanko A., Shuklina M., Kovaleva A., Zabrodskaya Y., Vidyeva I., Shaldzhya A., et al. Comparative immunological study in mice of inactivated influenza vaccines used in the Russian immunization program. *Vaccines.* 2020; 8(4): 756. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040756>
14. Ye H., Jia S., Zhang Y., Li J., Zhu F. Safety and immunogenicity of a novel quadrivalent subunit influenza vaccine in animal models. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 16(11): 2719–26. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1737456>
15. Privor-Dumm L.A., Poland G.A., Barratt J., Durrheim D.N., Knoll M.D., Vasudevan P., et al. A global agenda for older adult immunization in the COVID-19 era: A roadmap for action. *Vaccine.* 2021; 39(37): 5240–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.082>

Information about the authors

Georgy M. Ignatyev[✉] — D. Sci. (Med.), Professor, Deputy Head, Department for quality and innovative development, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia, e-mail: ignatjev_gm@chumakovs.su, <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Irina A. Leneva — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of experimental virology, Department of virology named after O.G. Anjaparidze, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Alena V. Atrasheuskaya — Head, R&D department, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Liubov I. Kozlovskaya — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3029-1035>

Карташова Надежда Петровна — н.с. лаб. экспериментальной вирусологии Отдела вирусологии им. О.Г. Анджаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>

Федякина Ирина Тимофеевна — с.н.с. лаб. экспериментальной вирусологии Отдела вирусологии им. О.Г. Анджаридзе НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6421-9632>

Шустова Елена Юрьевна — н.с. лаб. молекулярной биологии вирусов ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1314-0152>

Синюгина Александра Александровна — руководитель направления по качеству и инновационным разработкам ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7251-6570>

Зверев Виталий Васильевич — д.м.н., профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Трухин Виктор Павлович — к.ю.н., директор СПбНИИВС ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Ишмухаметов Айдар Айратович — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, генеральный директор ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 21.07.2021;
принята к публикации 26.09.2021;
опубликована 25.12.2021

Nadezhda P. Kartashova — researcher, Laboratory of experimental virology, Department of virology named after O. G. Anjaparidze, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>

Irina T. Fediakina — senior researcher, Laboratory of experimental virology, Department of virology named after O.G. Anjaparidze, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6421-9632>

Elena Yu. Shustova — researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1314-0152>

Aleksandra A. Sinyugina — Head, Quality and innovation development department Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7251-6570>

Vitaly V. Zverev — D. Sci. (Biol.), RAS Full Member, Professor, Head, Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Victor P. Trukhin — Cand. Sci. (Law), Director, Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6635-363X>

Aidar A. Ishmukhametov — D. Sci. (Med.), Professor, Corresponding member of RAS, General director, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 21.07.2021;
accepted for publication 26.09.2021;
published 25.12.2021