Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-624

Check for updates

Адаптация вирусов гриппа H2N2 с различной рецепторной специфичностью к клеткам MDCK: возможности для разработки культуральной пандемической вакцины против гриппа H2N2

Матюшенко В.А.✉, Костромитина А.Д., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Вирусы гриппа H2N2 вызвали пандемию в 1957 г. благодаря адаптации молекулы гемагглютинина от птичьего рецептора типа α2,3 к человеческому рецептору α2,6. Эти вирусы не циркулируют среди людей уже более 50 лет, но до сих пор встречаются в природном резервуаре, что указывает на их пандемический потенциал. Известно, что в начале пандемической волны вирусы с α2,3- и α2,6-рецепторной специфичностью могут циркулировать совместно и выбор того или иного изолята для разработки оптимальной пандемической гриппозной вакцины должен быть основан на убедительных научных данных. Хотя подавляющее большинство вакцин против гриппа производится с использованием развивающихся куриных эмбрионов, культура клеток млекопитающих может быть предпочтительным субстратом для производства вакцин против пандемического гриппа.

Материалы и методы. В настоящем исследовании мы изучили два варианта вируса A/Singapore/1/57 (H2N2), которые отличались рецепторной специфичностью, определяемой 3 остатками в молекуле HA1: E156, Q226, G228 для α2,3 птичьего типа (Sing-α2,3) и K156, L226, S228 для α2,6 человеческого типа (Sing-α2,6) рецепторной специфичности, а также методами обратной генетики получили пару штаммов живой гриппозной вакцины H2N2 на основе донора аттенуации A/Ленинград/17 и диких вирусов A/Singapore/1/57 (H2N2) с α2,3- и α2,6-рецепторной специфичностью. Мы провели серийное пассирование этих вирусов на клетках MDCK и проанализировали ростовые свойства изолированных методом бляшек клонов *in vitro* и *in vivo*, а также их иммуногенность и перекрёстную реактивность в мышиной модели.

Результаты. Адаптация к клеткам MDCK значительно увеличивала титры вирусов в клетках MDCK, однако на их рецепторную специфичность это не влияло. Вирусы с α2,6-рецепторной специфичностью вызывали образование более высоких титров гомологичных антител по сравнению с вирусами со специфичностью к α2,3-рецепторам, но эти антитела могли реагировать только с вирусами α2,6. Напротив, антитела, индуцированные вирусами с α2,3-рецепторной специфичностью, обладали широкой реактивностью против всех изученных вирусов. Аналогичные результаты были получены для пары штаммов живой гриппозной вакцины H2N2 на основе донора аттенуации A/Ленинград/17 с α2,3- и α2,6-рецепторной специфичностью при их изучении на сирийских хомячках.

Заключение. В случае новой передачи вирусов птичьего гриппа H2N2 в человеческую популяцию и совместной циркуляции вирусов с обеими рецепторными специфичностями для создания кросс-реактивных гриппозных вакцин следует выбирать вариант с α2,3-специфичностью.

Ключевые слова: *вирус гриппа, H2N2, рецепторная специфичность, адаптация, культура клеток MDCK, живая гриппозная вакцина, иммуногенность*

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). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 1/20 от 27.02.2020).

Благодарность. Авторы выражают благодарность всем сотрудникам отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины за помощь в проведении экспериментальных исследований, в особенности в. н. с. Екатерине Алексеевне Степановой, с. н. с. Екатерине Андреевне Баженовой, м. н. с. Полине Игоревне Прокопенко, с. н. с. Светлане Александровне Дониной.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках проекта Минобрнауки России FGWG-2025-0015.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. Адаптация вирусов гриппа H2N2 с различной рецепторной специфичностью к клеткам MDCK: возможности для разработки культуральной пандемической вакцины против гриппа H2N2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(1):31–42.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624
EDN: https://www.elibrary.ru/zffqga

© Матюшенко В.А., Костромитина А.Д., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н., 2025

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-624

Adaptation of H2N2 influenza viruses with different receptor specificity to MDCK cells: opportunities for the development of a cell-based vaccine against pandemic H2N2 influenza

Victoria A. Matyushenko✉, Arina D. Kostromitina, Larisa G. Rudenko, Irina N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. H2N2 influenza viruses caused a pandemic in 1957 due to the adaptation of avian influenza hemagglutinin from avian-type α2,3 to human-type α2,6 receptor specificity. These viruses have not circulated among humans for more than 50 years but are still found in avian reservoirs, indicating their pandemic potential. It is known that at the beginning of a pandemic wave, viruses with α2,3 and α2,6 receptor specificities can co-circulate, and the selection of one or another isolate for the development of a better pandemic influenza vaccine should be based on strong scientific evidence. Although the vast majority of influenza vaccines are produced in chicken embryos, mammalian cell culture may be a preferred substrate for the production of pandemic influenza vaccines.

Materials and methods. In this study, we investigated two variants of A/Singapore/1/57 (H2N2) virus which differed by their receptor specificity defined by three residues in the HA1 molecule: E156, Q226, G228 for α2,3 avian-type (Sing-α2,3) and K156, L226, S228 for α2,6 human-type (Sing-α2,6) receptor specificity. We conducted serial passaging of these viruses on MDCK cells and analyzed growth properties of plaque-purified clones *in vitro* and *in vivo*, as well as their immunogenicity and cross-reactivity in a mouse model.

Results. Adaptation to MDCK cells significantly increased viral titers in MDCK cells; however, their receptor specificity was not affected. Viruses with α2,6 receptor specificity induced higher titers of homologous antibodies compared to the viruses with α2,3 receptor specificity, but these antibodies could react only with the α2,6 viruses. In contrast, antibody induced by viruses with α2,3 receptor specificity had broad reactivity against all studied viruses. Similar results were obtained for the pair of A/Leningrad/17-based H2N2 live attenuated influenza vaccines with α2,3 and α2,6 receptor specificities in experiments on Syrian hamsters.

Conclusion. In the case of a new transmission of H2N2 avian influenza viruses to the human population and co-circulation of viruses with both receptor specificities, the variant with α2,3 specificity should be selected for the development of cross-reactive influenza vaccines.

Keywords: *influenza virus, H2N2, receptor specificity, adaptation, MDCK cells, live attenuated influenza vaccine, immunogenicity*

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). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (protocol No. 1/20, February 27, 2020).

Acknowledgement. The authors would like to thank all the staff of the Virology Department of the A.A. Smorodintsev Institute of Experimental Medicine for their help in conducting the experimental studies for their help in conducting experimental studies, especially leading researcher Ekaterina Alekseevna Stepanova, senior researcher Ekaterina Andreevna Bazhenova, junior researcher Polina Igorevna Prokopenko, senior researcher Svetlana Aleksandrovna Donina.

Funding source. The work was carried out within the framework of the FGWG-2025-0015 project of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Matyushenko V.A., Kostromitina A.D., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N. Adaptation of H2N2 influenza viruses with different receptor specificity to MDCK cells: opportunities for the development of a cell-based vaccine against pandemic H2N2 influenza. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(1):31–42.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624
EDN: https://www.elibrary.ru/zffqga

Введение

Птичий грипп является зоонозной инфекцией, представляющей высокую опасность для человека ввиду высокой смертности, достигающей 60% при заражении высокопатогенными подтипами H5N1, H7N9, H5N6, H10N8 [1–4]. «Азиатский» грипп подтипа H2N2 появился в Сингапуре в феврале 1957 г. и стремительно вызвал пандемию, которая унесла более 2,7 млн жизней. Известно, что причиной пандемий гриппа H2N2 в 1957 г. и H3N2 в 1968 г. стало переключение рецепторной специфичности вируса с птичьего сиалового рецептора α2,3 на человече-

© Matyushenko V.A., Kostromitina A.D., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N., 2025

ский α2,6, при этом в начале пандемической волны одновременно циркулировали вирусы гриппа с обоими типами рецепторной специфичности [5, 6]. Поскольку птицы являются основным резервуаром и переносят практически все известные подтипы вируса гриппа А, в том числе H2N2, то риски возвращения данных вирусов в циркуляцию среди людей оцениваются как достаточно высокие [7]. Учитывая снижение популяционного иммунитета к вирусам H2N2 из-за их длительного отсутствия в циркуляции, учёные всего мира призывают начать кампании по вакцинации против этих вирусов заранее, не дожидаясь начала пандемии [8].

Как известно, вакцинопрофилактика гриппа является оптимальным методом борьбы против этой инфекции и существует множество гриппозных вакцин для сезонного применения. Однако в условиях пандемии наиболее эффективной считается живая гриппозная вакцина (ЖГВ) [9, 10]. Подавляющее большинство гриппозных вакцин в мире производится в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), но при этом в последние десятилетия активно обсуждается вопрос о переводе производства гриппозных вакцин на перевиваемые клеточные линии, что позволит в короткие сроки нарабатывать большие объёмы вирусной биомассы, а также сузит список противопоказаний, в частности, позволит применять вакцину лицам, страдающим аллергией на куриный белок [11]. Кроме того, если пандемия гриппа будет вызвана высокопатогенным вирусом, то высока вероятность того, что поголовье кур на птицефабриках будет полностью уничтожено, поэтому независимость вакцинного производства от поставки яиц с птицефабрик также крайне важна. Таким образом, производство гриппозных вакцин целесообразно перевести на культуру клеток MDCK (культура клеток почки собаки породы Майдин–Дэрби), поскольку многочисленные исследования показывают, что именно в этой клеточной культуре вакцинные штаммы ЖГВ способны реплицироваться до титров, сопоставимых с РКЭ [12–14].

Основной **целью** настоящего исследования являлся поиск наиболее перспективного варианта вакцинного штамма культуральной ЖГВ A(H2N2), который следует использовать в начале пандемической волны. Для этого проводилось изучение двух вариантов пандемического вируса A/Singapore/1/57 (H2N2), различающихся рецепторной специфичностью, и вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на их основе. Была проведена адаптация вирусов к культуре клеток MDCK с последующим клонированием методом бляшек и оценкой рецепторной специфичности изолированных вариантов вирусов. Различающиеся по сиквенсу гена гемагглютинина (*HA*) варианты использовали для иммунизации лабораторных животных с целью выявления потенциального влияния адаптационных мутаций в поверхностных белках вируса на иммуногенность, антигенность и кросс-реактивность вырабатываемых после иммунизации антител.

Материалы и методы

Вирусы

В работе были использованы два варианта пандемического вируса A/Singapore/1/57 (H2N2), полученные из коллекции отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, различавшиеся по чувствительности к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови. Эксперименты с живыми вирусами H2N2 проводили в лаборатории с уровнем биобезопасности BSL-3.

Получение вакцинных штаммов ЖГВ методами обратной генетики

Гены *HA* и нейраминидазы (*NA*) клонировали в вектор для обратной генетики pCIPolISapIT с использованием универсальных пар праймеров, специфичных для каждого гена в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией [15]. Набор из 6 плазмидных ДНК с двунаправленным считыванием, кодирующих все сегменты донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), был подготовлен ранее [16]. Жизнеспособные вирусы гриппа получали при помощи электропорации клеток Vero с использованием системы трансфекции «Neon» («Invitrogen») и прилагающегося к нему набора «Neon Kit» 100 мкл.

Реакция гемагглютинации

Реакцию гемагглютинации (РГА) проводили по классической схеме с использованием куриных эритроцитов[1]. Для исследования рецепторной специфичности вирусов гриппа использовали модификацию РГА с ферментом экзосиалидазы exo-α-Sialidase (*Salmonella typhimurium*) («Megazyme»), который отщепляет с поверхности эритроцитов исключительно α2,3-рецепторы. Для постановки РГА использовали лошадиные эритроциты, которые на своей поверхности экспрессируют только α2,3-рецепторы; необработанные куриные эритроциты, которые экспрессируют оба типа рецепторов; куриные эритроциты, обработанные экзосиалидазой в течение 1 ч при 37ºС, т.е. несущие на своей поверхности только α2,6-рецепторы.

Считалось, что вирус обладал α2,3-рецепторной специфичностью, если его титр в РГА с лоша-

[1] WHO. Manual for the laboratory diagnosis of virological surveillance of influenza. Geneva;2011. URL: https://www.who.int/publications/i/item/manual-for-the-laboratory-diagnosis-and-virological-surveillance-of-influenza

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624

диными и куриными эритроцитами совпадал и при этом титр в РГА с обработанными куриными эритроцитами был равен 0. В обратном случае считалось, что вирус обладал α2,6-рецепторной специфичностью. Если же во всех РГА титр был положительный, считалось, что вирус обладает двойственной рецепторной специфичностью с преимуществом того типа, где был больший титр в РГА.

Накопление вирусов и определение инфекционного титра

Для накопления вирусов гриппа в куриных эмбрионах 10–11-дневные РКЭ заражали вируссодержащим материалом в объёме 0,2 мл, после чего эмбрионы инкубировали в течение 48–72 ч при 33–37ºС. Накопление вирусов в культуре клеток MDCK проводили на суточном монослое с конфлюентностью 90–95%, выращенным в среде DMEM с добавлением 1×антибиотика-антимикотика («Gibco») и 10% фетальной бычьей сыворотки («Биолот») при 37ºС в термостате с содержанием 5% CO_2. Для заражения культуры клеток MDCK готовый монослой дважды отмывали тёплым раствором фосфатно-солевого буфера (PBS), после чего добавляли вирусную суспензию в объёме 1, 2, 3 мл во флаконы Т-25, Т-75 и Т-175 соответственно. После контакта в течение 1 ч при 33ºС для вакцинных штаммов и 37ºС для диких вирусов вируса гриппа в термостате с содержанием 5% CO_2 инокулят удаляли и добавляли среду DMEM с 1×антибиотиком-антимикотиком и 1 мкг/мл трипсина TPCK («Sigma-Aldrich Co.»). Через 72 ч инкубации при 33ºС или 37ºС визуально оценивали цитопатическое действие вируса и определяли его титр в РГА.

Инфекционные титры вирусов в обеих системах культивирования определяли методом предельных разведений. РКЭ заражали последовательными разведениями вирусов на PBS в объёме 200 мкл и инкубировали при 33ºС и 37ºС в течение 48 ч, после чего определяли наличие вируса в РГА с куриными эритроцитами. Определение титра в клетках MDCK проводили на 96-луночных планшетах с суточным монослоем, при этом серийные 10-кратные разведения готовили на среде DMEM с антибиотиком-антимикотиком и 1 мкг/мл трипсина TPCK. После адсорбции инокулят удаляли, клетки промывали и инкубировали в поддерживающей среде в течение 3 сут. Наличие вирусов в лунках определяли методом РГА с куриными эритроцитами. Титры вирусов в РКЭ и клетках MDCK рассчитывали по методу Рида и Менча [17] и выражали в 50% эмбриональной (lg $ЭИД_{50}$/мл) и тканевой цитопатогенной (lg $ТЦИД_{50}$/мл) инфекционных дозах.

Адаптация вирусов к культуре клеток MDCK

Адаптацию вирусов гриппа к культуре клеток MDCK проводили при последовательном 5-кратном пассировании штаммов, за которым следовало клонирование вируса методом бляшек. Для этого на 6-луночные планшеты, засеянные накануне клетками MDCK, наносили 10-кратные разведения вирусов в 2 повторах. После часового контакта с регулярным покачиванием инокулят удаляли и в лунки вносили по 3 мл агарозового покрытия, полученного смешиванием равных объёмов двукратной среды DMEM (в присутствии антибиотика-антимикотика и 2 мкг/мл трипсина TPCK) и 1,6% легкоплавкой агарозы («Lonza»). На 3–5-й день инкубации визуально оценивали вирусные бляшки, выделяли 20–30 хорошо отделяемых друг от друга бляшек на предельных разведениях, из каждой выделенной бляшки изолировали отдельный клон вируса, который затем накапливали на культуре клеток MDCK, и полностью секвенировали гены поверхностных белков методом Сэнгера с помощью набора «BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1» («Thermo»).

Эксперименты с лабораторными животными

В экспериментах с животными использовали мышей линии CBA и сирийских хомячков (Столбовая). Исследование было одобрено Этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 1/20 от 27.02.2020).

Для оценки иммуногенности диких вирусов гриппа с различной рецепторной специфичностью были использованы самки мышей линии CBA, которых заражали интраназально в дозе 10^5 $ЭИД_{50}$/животное. Через 21 день животных эвтаназировали, после чего собирали сыворотки крови и смывы с верхних дыхательных путей (ВДП) для определения уровня гуморального иммунного ответа к различным вариантам вируса. Для оценки иммуногенности вакцинных штаммов ЖГВ H2N2 сирийских хомячков иммунизировали интраназально в дозе 10^5 lg $ЭИД_{50}$/животное, дважды с интервалом 21 день. На 21-й день после 2-й иммунизации животных эвтаназировали, собирали сыворотку крови, смывы с ВДП и бронхоальвеолярный лаваж.

Иммунологические методы

Исследование сывороток крови животных в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) проводили по стандартному протоколу[2] с куриными эритроцитами и обработкой сывороток рецептор-разрушающим ферментом («RDE», «Denka»). За титр сыворотки в РТГА принимали последнее разведение, при котором наблюдалось полное торможение гемагглютинации эритроцитов.

[2] WHO. Manual for the laboratory diagnosis of virological surveillance of influenza. Geneva;2011. URL: https://www.who.int/publications/i/item/manual-for-the-laboratory-diagnosis-and-virological-surveillance-of-influenza

Иммуноферментный анализ

Постановку иммуноферментного анализа (ИФА) с образцами от животных осуществляли с использованием в качестве антигена очищенных на градиенте плотности сахарозы вирусов гриппа. Антиген вносили в 96-луночные планшеты с высокой сорбцией («Corning») в количестве 16 АЕ в 50 мкл и инкубировали в течение ночи при 4ºС. Планшеты промывали 3 раза отмывочным буфером (PBS + 0,05% Twin-20 («Биолот»)), после чего проводили блокировку несвязанных сайтов с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина.

Двукратные разведения сывороток или смывов с дыхательных путей готовили в отдельных круглодонных планшетах, которые затем переносили в лунки отмытого от блокировочного раствора планшета. После инкубации в течение 1 ч при 37°С планшеты снова промывали 3 раза отмывочным буфером, подсушивали и вносили вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена: анти-IgG мыши (1 : 10 000), анти-IgA мыши (1 : 2000), анти-IgG хомяка (1 : 5000) и анти-IgA хомяка (1 : 300). Инкубировали 1 ч при 37ºС, после чего 5 раз промывали планшет отмывочным буфером, подсушивали и добавляли 50 мкл/лунку субстрата TMB («Thermo»), который инкубировали в темноте до 20 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1М H_2SO_4. Первичные результаты ИФА учитывали на спектрофотометре («Bio-Rad») при длине волны 450 нм. За титр антител принимали последнее разведение, при котором оптическая плотность (ОП) превышала двукратный средний уровень контрольных лунок. Рассчитывали площадь под кривой ОП с помощью программного пакета «GraphPad Prizm 7».

Статистическая обработка данных

Для сравнения данных использовали непараметрический U-test Манна–Уитни; t-критерий Стьюдента и ANOVA с помощью программного обеспечения «GraphPad Prizm 7». Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Два варианта пандемического штамма A/Singapore/1/57 (H2N2) были восстановлены из ампул с материалом, лиофилизированным в 1975 г., при этом точная пассажная история вирусов неизвестна. Накопленные в РКЭ вирусы различались по уровню чувствительности к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови морской свинки. Полногеномное секвенирование показало, что у этих вирусов в субъединице HA1 присутствуют аминокислотные отличия в позициях 156 (E/K), 226 (Q/L) и 228 (G/S) (**таблица**). По данным литературы, замены в позициях 226 и 228 отвечают за рецепторную специфичность вируса гриппа [5, 6]. Действительно, оценка сродства этих вирусов к рецепторам на поверхности эритроцитов в РГА с различными типами эритроцитов показала, что вирус с остатками E156, Q226 и G228 обладает α2,3-рецепторной специфичностью (обозначен как Sing-α2,3), а вариант с остатками K156, L226 и S228 имеет сродство к α2,6-рецепторам (Sing-α2,6) (**рис. 1**, *а*). Аминокислотная замена *K19T* была обнаружена в молекуле NA, но поскольку она находится в трансмембранном домене, то влияния на рецепторную специфичность не имеет (таблица). Адаптация исследуемых вирусов к культуре клеток MDCK и последующее клонирование бляшками позволило выделить 3 дополнительных варианта вирусов с отличающимися последовательностями HA: Sing-α2,6-EP с мутациями *G158E* и *L321P* в субъединице HA1, Sing-α2,3-S с мутацией *P221S* в субъединице HA1 и Sing-α2,3-V с мутацией *A96V* в субъединице HA2 (таблица).

Изучение MDCK-адаптированных вариантов в РГА показало, что штамм Sing-α2,6-EP имеет сродство к α2,6-рецепторам, а варианты Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V — к α2,3-рецепторам (рис. 1, *а*). Таким

Аминокислотные различия в поверхностных белках исследуемых вариантов вируса A/Singapore/1/57 (H2N2)
Amino acid substitutions in surface proteins of investigated variants of A/Singapore/1/57 (H2N2) virus

Вирус Virus	HA							NA
	HA1						HA2	
	156	158	221	226	228	321	96	19
Исходные штаммы, накопленные в РКЭ | Original strains accumulated in the Egg								
Sing-α2,6	Lys	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Thr
Sing-α2,3	Glu	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	Ala	Lys
MDCK-адаптированные штаммы | MDCK-adapted strains								
Sing-α2,6-EP	Lys	Glu	Pro	Leu	Ser	Pro	Ala	Thr
Sing-α2,3-S	Glu	Gly	Ser	Gln	Gly	Leu	Ala	Lys
Sing-α2,3-V	Glu	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	Val	Lys

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624

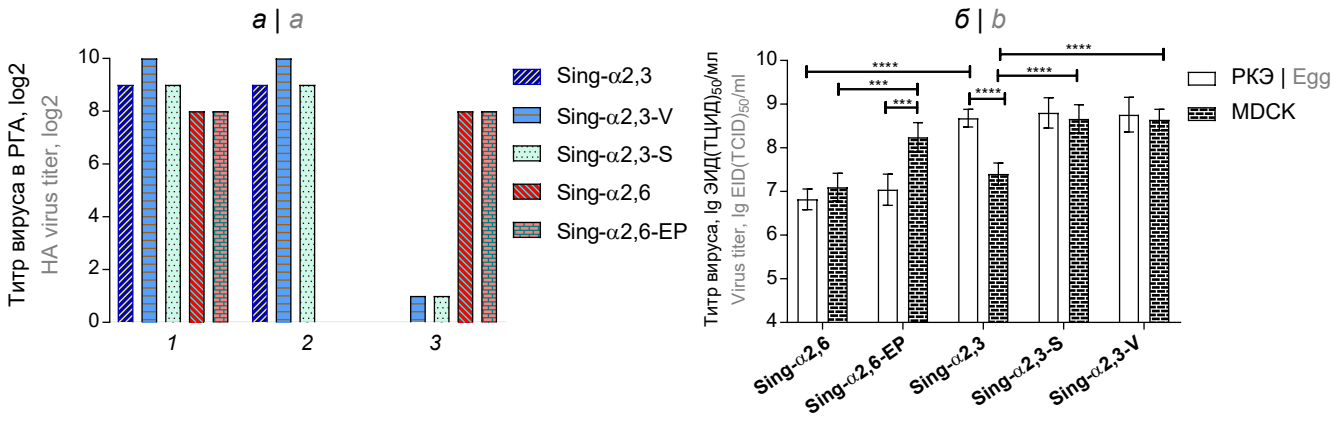

Рис. 1. Характеристика исследуемых вирусов *in vitro*.

а — титры вирусов в РГА с необработанными куриными эритроцитами (*1*), лошадиными эритроцитами (*2*) и куриными эритроцитами, обработанными экзосиалидазой (*3*); *б* — инфекционная активность исследуемых вирусов в системе РКЭ и культуре клеток MDCK.

Fig. 1. Characterization of the studied viruses *in vitro*.

a — titers of viruses in HA with untreated chicken erythrocytes (*1*), horse erythrocytes (*2*) and chicken erythrocytes treated with exosialidase (*3*); *b* — infectious activity of the studied viruses in the Egg and MDCK cells.

образом, адаптация «диких» вирусов гриппа H2N2 к культуре клеток млекопитающих не оказывает существенного влияния на их рецепторную специфичность.

Кроме этого, была исследована инфекционная активность всех вирусов в РКЭ и культуре клеток MDCK. Установлено, что вирус Sing-α2,3 в среднем на 2 порядка лучше размножался в системе РКЭ, чем вирус Sing-α2,6, при этом их титры в культуре клеток MDCK были сопоставимы (рис. 1, *б*). Важно отметить, что инфекционная активность MDCK-адаптированных вариантов в культуре клеток была значительно выше, чем у соответствующих исходных вирусов. Таким образом, отмечен вклад мутаций *G158E* и *L321P*, *P221S* в субъединице HA1 и *A96V* в субъединице HA2 в увеличение инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK (рис. 1, *б*).

Иммунизация мышей линии CBA исходными штаммами Sing-α2,6 и Sing-α2,3, а также MDCK-адаптированными вариантами приводила к образованию более высоких уровней гомологичных сывороточных антител у вирусов Sing-α2,6 и Sing-α2,6-EP по сравнению с вирусами, имеющими сродство к α2,3-рецепторам (**рис. 2**, *а*, *б*). При этом адаптированные к клеткам варианты Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V индуцировали значительно меньшие уровни гомологичных сывороточных IgG-антител по сравнению с исходным вариантом Sing-α2,3 (рис. 2, *б*). Исследование местного гуморального иммунного ответа показало существенные приросты секреторных IgA-антител у всех 5 исследуемых вирусов: Sing-α2,6, Sing-α2,6-EP, Sing-α2,3, Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V (рис. 2, *в*). Сравнение уровней IgA-антител в группах исходных вирусов Sing-α2,6 и Sing-α2,3 различий не выявило (p = 0,3355), что отличается от данных по системному гуморальному ответу. Тем не менее сравнительный анализ уровней секреторных IgA-антител между группами вирусов, заражённых MDCK-адаптированными вариантами Sing-α2,6-EP, Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V, как и в системном ответе, выявил превосходство вируса Sing-α2,6-EP. Суммируя данные об индукции системного и локального иммунного ответа исследуемыми вирусами, можно заключить, что все указанные вирусы индуцируют гуморальный ответ, однако наименее иммуногенны оказались MDCK-адаптированные варианты с рецепторной специфичностью α2,3 (Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V) на уровне как системного, так и локального гуморального иммунитета. Наоборот, вирусы Sing-α2,6, Sing-α2,6-EP с рецепторной специфичностью α2,6 не отличались по иммуногенности ни в одном из тестов.

Далее была проведена оценка кросс-реактивности сывороточных антител, выработанных при введении 5 исследованных вариантов вируса A/Singapore/1/57 (H2N2), в отношении каждого варианта в РТГА и ИФА. Интересно, что при использовании в качестве антигенов в РТГА вирусов с α2-6-рецепторной специфичностью выявлялись существенно более высокие показатели титров антител во всех иммунизированных группах, по сравнению с антигенами, обладающими α2-3-специфичностью (**рис. 3**, *а*). При этом антитела в сыворотках группы Sing-α2,6 не уловили ни один из 3 вариантов вирусов с α2-3-рецепторной специфичностью. Несмотря на то что у мышей, иммунизированных MDCK-адаптированным вариантом Sing-α2,6-EP, выявлялись титры антител выше уровня детекции, статистически значимых отличий с группой контроля не обнаружено. Исследование кросс-реактивности сывороточных IgG-антител методом ИФА показало схожие результаты: вирусы с α2-6-рецепторной специфичностью в качестве антигенов выявляли наиболее высокие значения титров антител во всех

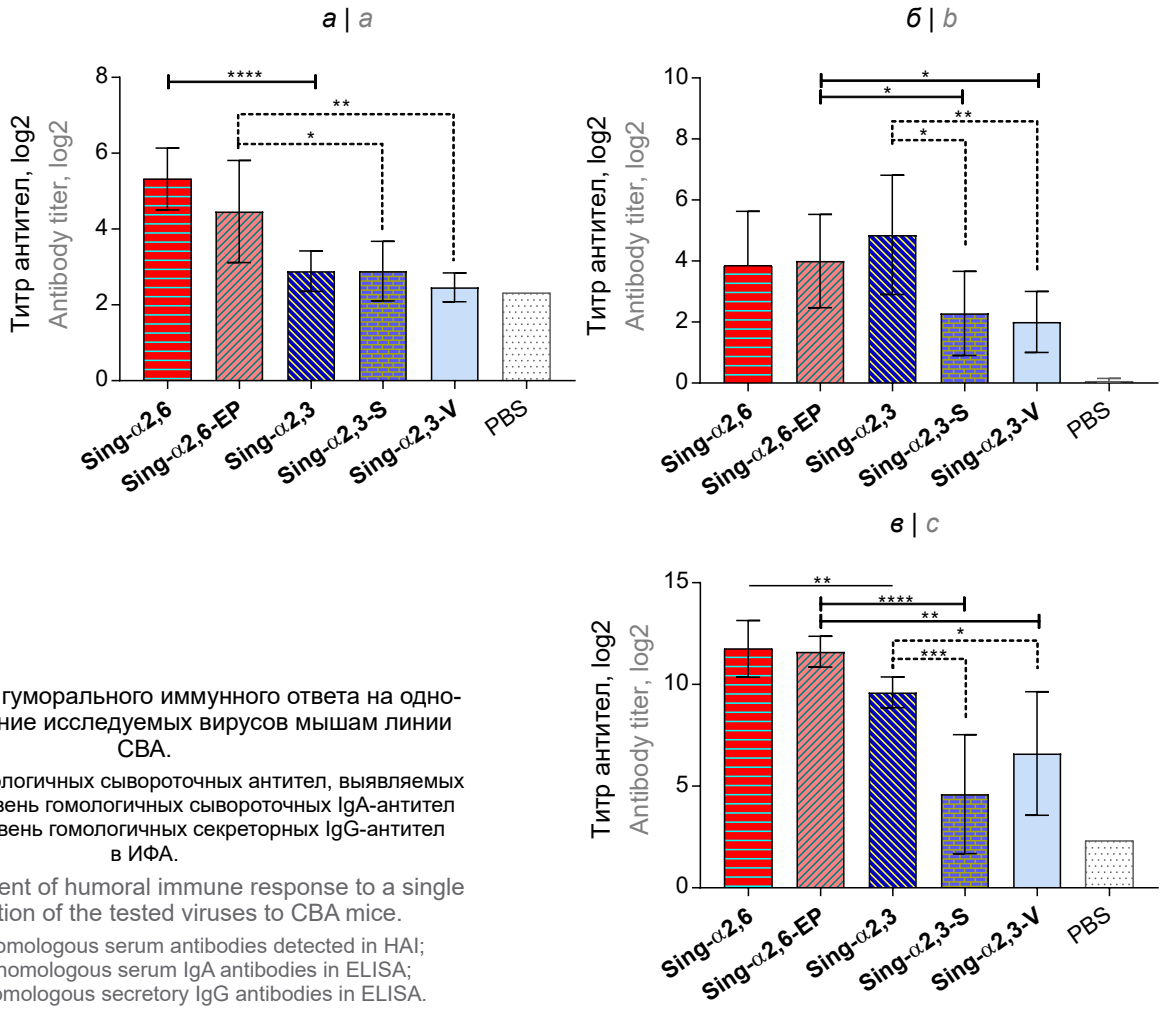

Рис. 2. Оценка гуморального иммунного ответа на однократное введение исследуемых вирусов мышам линии СВА.

а — уровень гомологичных сывороточных антител, выявляемых в РТГА; *б* — уровень гомологичных сывороточных IgA-антител в ИФА; *в* — уровень гомологичных секреторных IgG-антител в ИФА.

Fig. 2. Assessment of humoral immune response to a single administration of the tested viruses to CBA mice.

a — level of homologous serum antibodies detected in HAI; *b* — level of homologous serum IgA antibodies in ELISA; *c* — level of homologous secretory IgG antibodies in ELISA.

группах, тогда как связывание антител с вирусами с α2,3-рецепторной специфичностью было значительно слабее у животных всех групп (рис. 3, *б*).

Важно отметить, что вирусы с α2-6-рецепторной специфичностью в качестве антигена одинаково хорошо связывали антитела в сыворотках мышей из всех исследуемых групп, за исключением группы животных, иммунизированных вирусом Sing-α2,3-V, в которой титры антител к вирусам Sing-α2,6 и Sing-α2,6-EP достоверно отличались от титров антител в других группах (рис. 3, *а*). В группах животных, иммунизированных MDCK-адаптированными вариантами с α2-3-рецепторной специфичностью, наблюдалась обратная ситуация: титры IgG-антител к вирусам Sing-α2,3-S и Sing-α2,3-V во всех иммунизированных группах были снижены; при этом замену *P221S* в субъединице HA1 можно охарактеризовать как escape-мутацию, поскольку вирус Sing-α2,3-S наиболее эффективно уходит от распознавания антителами у всех исследованных вариантов иммуногенов (рис. 3, *б*).

В целом полученные результаты указывают на то, что для производства клеточной пандемической вакцины H2N2 наиболее подходящими вирусами являются варианты с α2-3-рецепторной специфичностью, адаптированные к культуре клеток MDCK или выделенные на ней.

Для подтверждения этой гипотезы мы сконструировали методами обратной генетики 2 штамма живой гриппозной вакцины H2N2 на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57: A/17/Singapore/57/1 с генами *HA* и *NA* от вируса Sing-α2,3 (обозначен как 17/Sing-α2,3) и A/17/Singapore/57/2 с генами *HA* и *NA* от вируса Sing-α2,6 (17/Sing-α2,6). РГА с различными эритроцитами подтвердило рецепторную специфичность полученных вакцинных вирусов, которая совпадала с соответствующим диким вирусом (**рис. 4**, *а*), что ещё раз указывает на ключевую роль HA в связывании с гликановыми рецепторами клетки-хозяина. Важно отметить, что адаптация вакцинных штаммов к клеткам MDCK не привела к появлению новых мутаций в молекуле HA: более 50 накопленных из бляшек вирусов соответствовали исходному штамму ЖГВ. Оценка инфекционной активности сконструированных вирусов показала, что вакцинные штаммы 17/Sing-α2,3 и 17/Sing-α2,6 одинаково хорошо размножались в культуре клеток MDCK,

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624

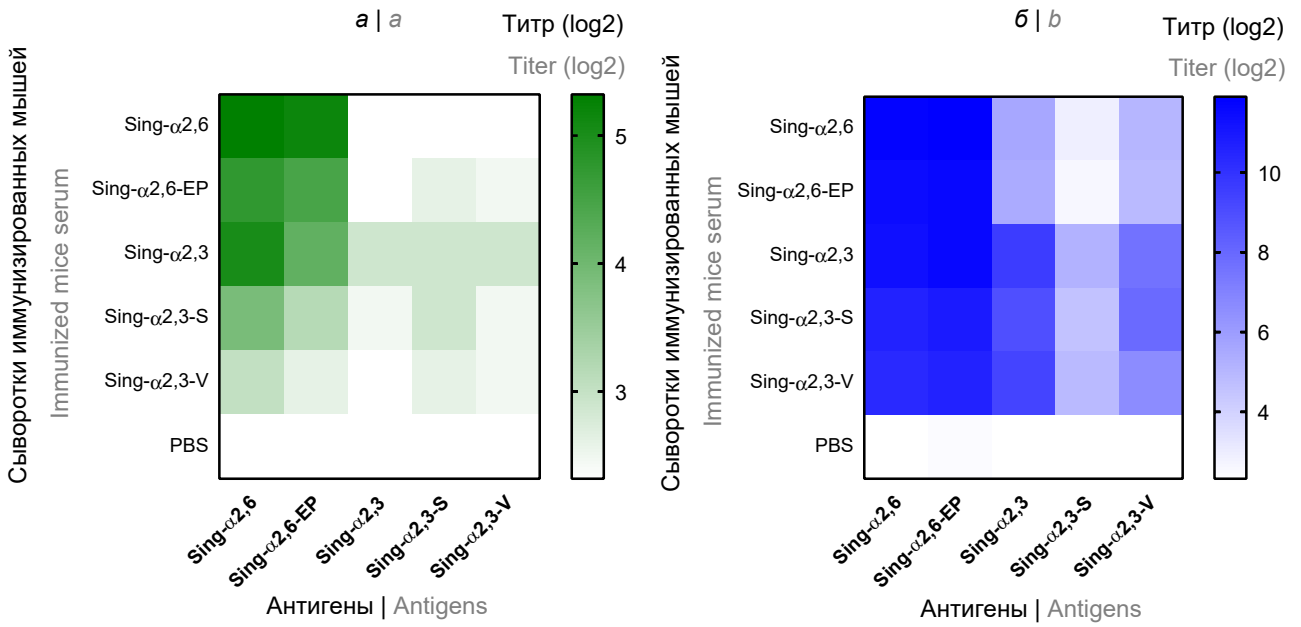

Рис. 3. «Тепловая карта» иммуногенности и кросс-реактивности исследуемых вариантов вируса A/Singapore/1/57 (H2N2) в эксперименте на мышах (*n* = 7).

а — средние значения уровней антигемагглютинирующих антител у всех иммунизированных групп в отношении различных вирусных антигенов; *б* — средние значения уровней сывороточных IgG-антител у всех иммунизированных групп в отношении различных вирусных антигенов.

Fig. 3. Heat map of the immunogenicity and cross-reactivity of investigated variants of A/Singapore/1/57 (H2N2) virus in the experiment on mice (*n* = 7).

a — mean values of the levels of anti-hemagglutinating antibodies in all immunized groups against different viral antigens; *b* — mean values of the levels of serum IgG antibodies in all immunized groups against different viral antigens.

тогда как в РКЭ вирус 17/Sing-α2,3 имел инфекционный титр на порядок выше, чем у вируса 17/Sing-α2,6 (рис. 4, *б*).

Двукратная иммунизация сирийских хомячков генно-инженерными вакцинными штаммами 17/Sing-α2,3 и 17/Sing-α2,6 приводила к формированию у животных схожих уровней сывороточных IgG-антител, связывающихся с антигеном Sing-α2,3, при этом вакцинный вирус 17/Sing-α2,3 индуцировал достоверно больше антител к антигену Sing-α2,6, чем к собственному антигену Sing-α2,3 (**рис. 5**). Полученные результаты полностью согласуются с результатами изучения антигенности пандемических вариантов A/Singapore/1/57 в эксперименте на мышах (рис. 3).

Проведено исследование кросс-реактивности локальных IgA-антител в смывах с ВДП и нижних дыхательных путей в ИФА с теми же вирусны-

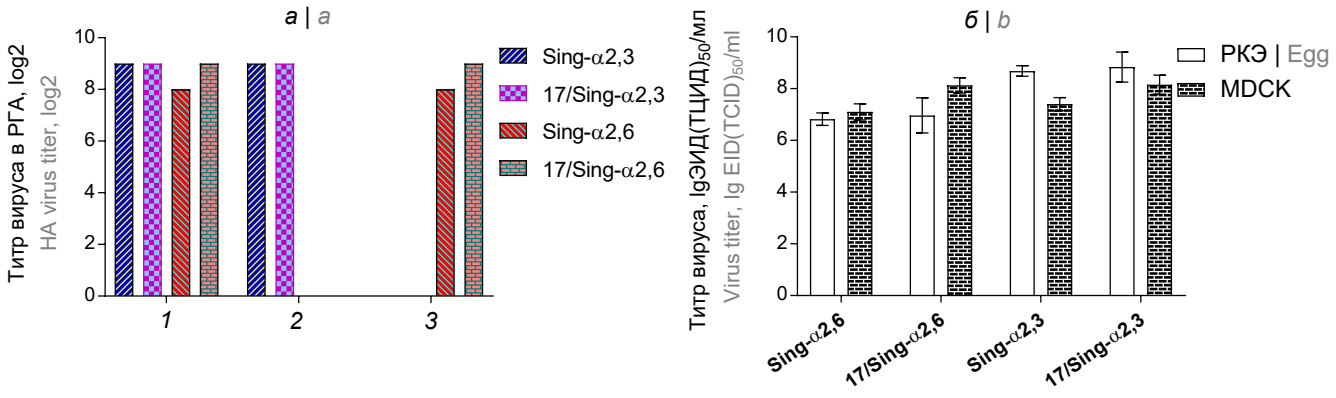

Рис. 4. Характеристика исследуемых вакцинных штаммов ЖГВ H2N2 *in vitro*.

а — титры вирусов в РГА с необработанными куриными эритроцитами (*1*), лошадиными эритроцитами (*2*), куриными эритроцитами, обработанными экзосиалидазой (*3*); *б* — инфекционная активность исследуемых вирусов в системе РКЭ и культуре клеток MDCK.

Fig. 4. Characterization of the investigated vaccine strains of H2N2 LIV *in vitro*.

a — virus titers in HA assays with untreated chicken erythrocytes (*1*), horse erythrocytes (*2*), chicken erythrocytes treated with exosialidase (3); *b* — infectious activity of the studied viruses in the Egg system and MDCK cell culture.

ми антигенами. Использование вируса Sing-α2,6 в качестве антигена позволило выявить существенно более высокие уровни секреторных вирусспецифических антител по сравнению с использованием в качестве антигена вируса Sing-α2,3 (рис. 5).

Таким образом, из представленных результатов следует, что вирусы гриппа подтипа H2N2 с α2-3-рецепторной специфичностью индуцируют антитела, обладающие более широкой кросс-реактивностью в отношении вирусов с различной рецепторной специфичностью, по сравнению с антителами, образованными при введении вирусов, имеющих сродство к α2-6-рецепторам. Данный феномен необходимо учитывать при выборе штамма для подготовки вакцины в случае наступления пандемии гриппа H2N2.

Обсуждение

Вирусы гриппа A(H2N2) циркулировали в человеческой популяции с 1957 по 1968 г., после чего они были вытеснены вирусами A(H3N2), вызвавшими пандемию «гонконгского» гриппа [18]. Поскольку вирусы H2N2 не инфицируют людей уже более 50 лет, можно говорить о чрезвычайно низком уровне популяционного иммунитета к данным вирусам, и люди, рождённые после 1968 г., являются наиболее уязвимой группой в случае возвращения вирусов H2N2 в циркуляцию [19]. Учитывая сохранность вирусов гриппа с гемагглютинином H2 в природном резервуаре [20–22], вероятность наступления новой пандемии гриппа H2N2 оценивается как высокая [7]. В этой связи исследования, направленные на разработку и детальное изучение потенциально пандемических вакцин против вирусов данного подтипа, чрезвычайно важны и актуальны.

Ранее нами была разработана и изучена в доклинических и клинических исследованиях ЖГВ против вируса H2N2, циркулировавшего в конце пандемической волны, — A/Калифорния/1/66 (H2N2) [23, 24], и данная вакцина может быть использована для иммунизации наиболее уязвимых групп населения в случае возвращения в циркуляцию антигенно схожих вирусов H2N2. Однако результаты мониторинга за вирусами гриппа птиц показывают, что большинство изолятов подтипа H2N2 остаются антигенно сходными с пандемическим вирусом A/Singapore/1/57 и сохраняют предпочтение к сиаловым α2,3-рецепторам птичьего типа [7]. Детальные исследования влияния рецепторной специфичности вирусов на их трансмиссивность в экспериментах на хорьках показали, что при переключении рецептора с α2,3- на α2,6-тип существенно повышается способность вируса передаваться воздушно-капельным путём, что может сыграть решающую роль в пандемическом распространении вирусов H2N2 [25]. Тем не менее в литературе отсутствуют чёткие данные о том, какие именно вирусы лучше использовать для подготовки вакцин в начале пандемии, вызванной вирусами гриппа птиц и обладающих сродством к обоим типам клеточных рецепторов.

В настоящей работе мы провели модельный эксперимент с пандемическими вариантами вируса A/Singapore/1/57, социркулировавшими в 1957 г. и отличающимися рецепторной специфичностью молекулы HA, которая определялась 3 аминокислотными отличиями в субъединице HA1: E156, Q226, G228 — у варианта Sing-α2,3 и K156, L226, S228 — у варианта Sing-α2,6. Поскольку пандемические вакцины целесообразно производить на перевиваемых клеточных линиях для повышения качества продукта и возможности ускоренного масштабирования производства [11, 26], мы проводили серийное пассирование как исходных пандемических вирусов Sing-α2,3 и Sing-α2,6, так и реассортантных вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на их основе, в культуре клеток MDCK с последующей идентификацией новых замен в молекуле HA. Интересно, что адаптационные мутации возникали при пассажах только пандемических вирусов в клетках, но не вакцинных штаммов ЖГВ. Это может быть связано с тем, что пандемические варианты представляли собой гетерогенную популяцию вирусов с неизвестной пассажной историей, тогда как вакцинные вирусы прошли только два пассажа в РКЭ после сборки из плазмид и представляли собой более гомогенную популяцию. Важно отметить, что обнаруженные нами мутации не повлияли на рецепторную специфичность вирусов, но оказывали влияние на их антигенность. В частности, мутация *P221S* в субъединице HA1 носила характер escape-мутации, поскольку позволяла избегать распознавания антителами в сыворотках животных, иммунизированных всеми исследованными вариантами A/Singapore/1/57. Интересно, что аналогичная мутация была описана для вирусов гриппа птиц подтипа H9N2, при этом она снижала сродство вируса к аналогу птичьего α2,3-рецептора, но в комбинации с мутацией *L226Q* сродство к данному рецептору восстанавливалось [27], что полностью совпадает с нашими результатами. Кроме того, мутация *P221S* обнаруживалась у вируса A/Wyoming/3/2003 (H3N2) при его серийном пассировании в клетках MDCK [28], что также подтверждает адаптационный характер данной замены.

Заключение

Наиболее важным результатом исследования является демонстрация более широкой кросс-реактивности антител, вырабатываемых при интраназальной иммунизации животных вирусами H2N2 с α2,3-рецепторной специфичностью. Причём это было показано как для пандемических вирусов A/Singapore/1/57, так и для вакцинных реассортант-

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(1)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-624
ORIGINAL RESEARCHES

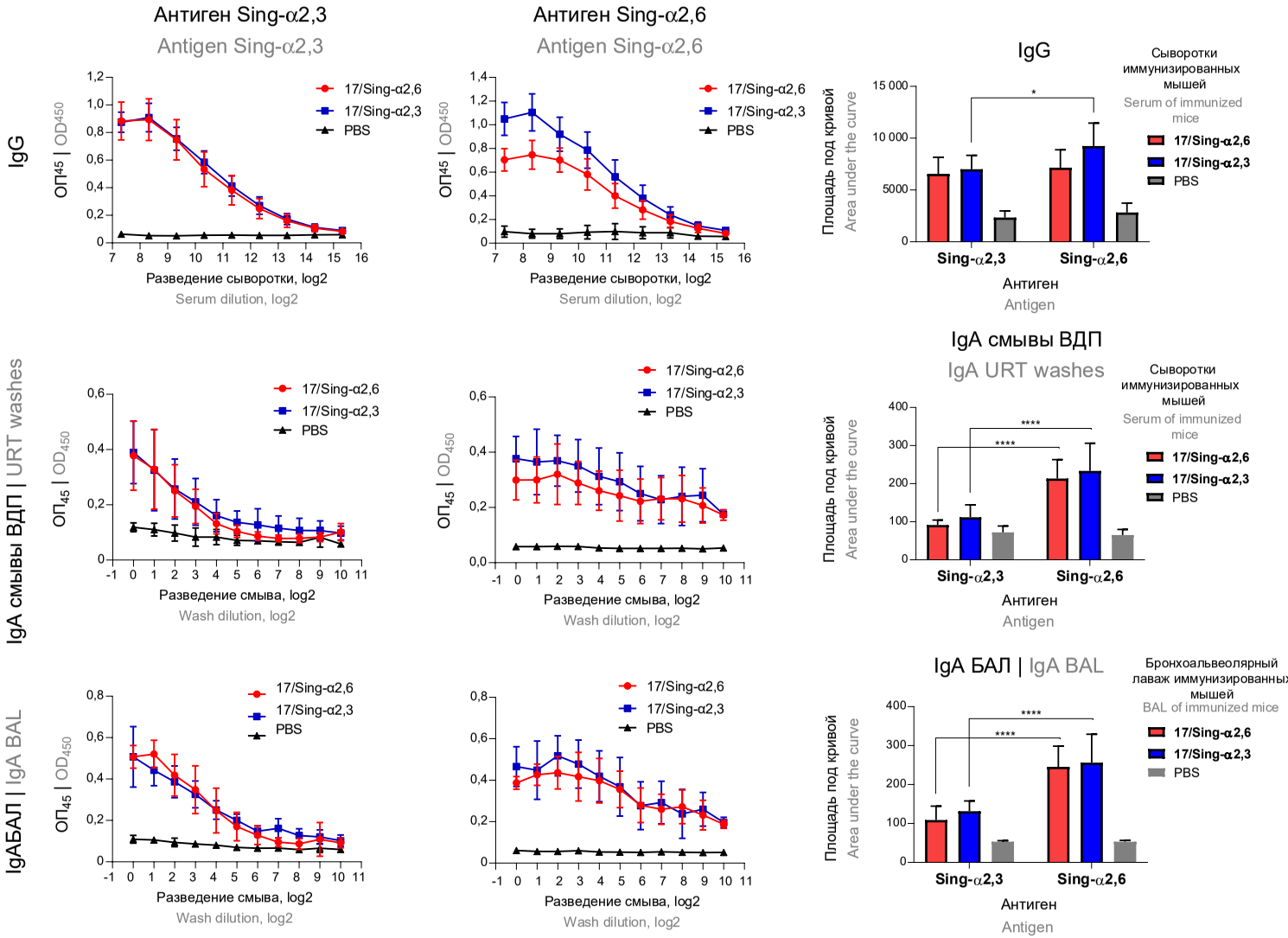

Рис. 5. Оценка гуморального иммунного ответа на двукратное введение исследуемых вакцинных штаммов ЖГВ сирийским хомячкам.

Слева представлены значения $ОП_{450}$ при различных разведениях сывороток или смывов с ВДП и бронхоальвеолярного лаважа к вирусу Sing-α2,3 в ИФА. Посередине представлены значения $ОП_{450}$ при различных разведениях сывороток или смывов к вирусу Sing-α2,6 в ИФА. Справа — значения площади под кривой ОП при длине волны 450 нм в ИФА с соответствующим антигеном.

Fig. 5. Evaluation of the humoral immune response to twice-daily administration of the tested vaccine strains of LIV to Syrian hamsters.

On the left are OD_{450} values at different dilutions of sera or washes from URT and bronchoalveolar lavage to Sing-α2,3 virus in ELISA. In the middle are OD_{450} values at different dilutions of sera or washes to Sing-α2,6 virus in ELISA. On the right are the area under the optical density curve at 450 nm in ELISA with the corresponding antigen.

ных штаммов ЖГВ, полученных методами обратной генетики. Тут важно отметить, что вакцинный штамм ЖГВ 17/Sing-α2,3 подходит для производства на культуре клеток, поскольку достигает высокого инфекционного титра в культуре клеток MDCK, а гомогенная природа штамма за счёт его подготовки генно-инженерными методами обеспечит генетическую стабильность вакцины при серийных пассажах на клетках MDCK, что говорит в пользу массовой наработки вакцины в первую волну пандемии. Кроме того, такой выбор штамма для производства пандемической клеточной ЖГВ позволит максимально увеличить репродукцию вакцинного штамма в культуре клеток MDCK, а также обеспечит высокую эффективность вакцины благодаря полноценному антигенному охвату циркулирующих вирусов гриппа в случае пандемии.

Несмотря на то что выдвинутая нами гипотеза нашла экспериментальное подтверждение на различных животных моделях, для потенциального широкого применения штамма ЖГВ 17/Sing-α2,3 среди людей требуется изучение его иммуногенности и кросс-реактивности в клинических испытаниях. Одним из препятствий к использованию штамма ЖГВ 17/Sing-α2,3 в клинической практике может служить потенциально сниженная репликативная активность вируса в ВДП людей, поскольку у людей α2,3-рецепторы слабо представлены в ВДП и преимущественно экспрессируются в нижних отделах респираторного тракта [29], где вакцинный вирус не размножается в силу своего температурно-чувствительного фенотипа, и это может привести к низкой иммуногенности ЖГВ. Однако опыт иммунизации людей ЖГВ против птичьего гриппа H5N1, возбудитель которого также имеет α2,3-рецепторную специфичность, показал, что даже в отсутствие репликации в ВДП и при низких уровнях сывороточных антител к вирусу после интраназальной иммунизации ЖГВ формирует долгоживущий иммунный ответ, который может быть демаскирован путём введения инактивированной гриппозной вакцины несколько месяцев и даже лет спустя [30, 31]. Соответственно, стратегия гетерологичной прайм-буст-иммунизации в начале пандемии гриппа H2N2 также может рассматриваться как наиболее перспективная для формирования мощного долгоживущего гуморального иммунитета с широким спектром защиты.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Charostad J., Rezaei Zadeh Rukerd M., Mahmoudvand S., et al. A comprehensive review of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1: An imminent threat at doorstep. *Travel Med. Infect. Dis.* 2023;55:102638. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2023.102638
2. Tanner W.D., Toth D.J., Gundlapalli A.V. The pandemic potential of avian influenza A(H7N9) virus: a review. *Epidemiol. Infect.* 2015;143(16):3359–74. DOI: https://doi.org/10.1017/s0950268815001570
3. Chen H., Yuan H., Gao R., et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet*. 2014;383(9918):714–21. DOI: https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60111-2
4. Yang Z.F., Mok C.K., Peiris J.S., Zhong N.S. Human infection with a novel avian influenza A(H5N6) virus. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(5):487–9. DOI: https://doi.org/10.1056/nejmc1502983
5. Connor R.J., Kawaoka Y., Webster R.G., Paulson J.C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*. 1994;205(1):17–23. DOI: https://doi.org/10.1006/viro.1994.1615
6. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* 2000;74(18):8502–12. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8502-8512.2000
7. Jones J.C., Baranovich T., Marathe B.M., et al. Risk assessment of H2N2 influenza viruses from the avian reservoir. *J. Virol.* 2014;88(2):1175–88. DOI: https://doi.org/10.1128/jvi.02526-13
8. Nabel G.J., Wei C.J., Ledgerwood J.E. Vaccinate for the next H2N2 pandemic now. *Nature*. 2011;471(7337):157–8. DOI: https://doi.org/10.1038/471157a
9. Rudenko L., Isakova-Sivak I. Pandemic preparedness with live attenuated influenza vaccines based on A/Leningrad/134/17/57 master donor virus. *Expert Rev. Vaccines.* 2015;14(3):395–412. DOI: https://doi.org/10.1586/14760584.2015.979159
10. Chen G.L., Subbarao K. Live attenuated vaccines for pandemic influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2009;333:109–32. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-92165-3_5
11. Hegde N.R. Cell culture-based influenza vaccines: a necessary and indispensable investment for the future. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015;11(5):1223–34. DOI: https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1016666
12. Hussain A.I., Cordeiro M., Sevilla E., Liu J. Comparison of egg and high yielding MDCK cell-derived live attenuated influenza virus for commercial production of trivalent influenza vaccine: *in vitro* cell susceptibility and influenza virus replication kinetics in permissive and semi-permissive cells. *Vaccine.* 2010;28(22):3848–55. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.005
13. Liu J., Shi X., Schwartz R., Kemble G. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine*. 2009;27(46):6460–3. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.024
14. Киселева И.В., Исакова И.Н., Ларионова Н.В. и др. Эффективность получения реассортантов между эпидемическими и холодоадаптированнымн вирусами гриппа в развивающихся куриных эмбрионах и в культуре клеток MDCK. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2007; 84(6):40–5. Kiseleva I.V., Isakova I.N., Larionova N.V., et al. Efficacy of production of reassortants between epidemic and cold-adapted influenza viruses in growing chicken embryos and in MDCK cell culture. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2007;84(6):40–5. EDN: https://elibrary.ru/iisqbx
15. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2000;97(11):6108–13. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.100133697
16. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., et al. 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. DOI: https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.004
17. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938;27(3):493–7.

18. Kilbourne E.D. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg. Infect. Dis.* 2006;12(1):9–14. DOI: https://doi.org/10.3201/eid1201.051254
19. Babu T.M., Perera R.A.P.M., Wu J.T., et al. Population serologic immunity to human and avian H2N2 viruses in the United States and Hong Kong for pandemic risk assessment. *J. Infect. Dis.* 2018;218(7):1054–60. DOI: https://doi.org/10.1093/infdis/jiy291
20. Ma W., Vincent A.L., Gramer M.R., et al. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007;104(52):20949–54. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0710286104
21. Schäfer J., Khristova M.L., Busse T.L., et al. Analysis of internal proteins of influenza A (H2N2) viruses isolated from birds in East Germany in 1983. *Acta Virol.* 1992;36(2):113–20.
22. Makarova N.V., Kaverin N.V., Krauss S., et al. Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America. *J. Gen. Virol.* 1999;80(Pt. 12):3167–71. DOI: https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-12-3167
23. Isakova-Sivak I., de Jonge J., Smolonogina T., et al. Development and pre-clinical evaluation of two LAIV strains against potentially pandemic H2N2 influenza virus. *PloS One*. 2014;9(7):e102339. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102339
24. Isakova-Sivak I., Stukova M., Erofeeva M., et al. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015;11(4):970–82. DOI: https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1010859
25. Pappas C., Viswanathan K., Chandrasekaran A., et al. Receptor specificity and transmission of H2N2 subtype viruses isolated from the pandemic of 1957. *PloS One*. 2010;5(6):e11158. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011158
26. Genzel Y., Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2009;8(12): 1681–92. DOI: https://doi.org/10.1586/erv.09.128
27. An S.H., Son S.E., Song J.H., et al. Selection of an optimal recombinant Egyptian H9N2 avian influenza vaccine strain for poultry with high antigenicity and safety. *Vaccines (Basel).* 2022;10(2):162. DOI: https://doi.org/10.3390/vaccines10020162
28. Barnard K.N., Wasik B.R., Alford B.K., et al. Sequence dynamics of three influenza A virus strains grown in different MDCK cell lines, including those expressing different sialic acid receptors. *J. Evol. Biol.* 2021;34(12):1878–900. DOI: https://doi.org/10.1111/jeb.13890
29. de Graaf M., Fouchier R.A. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J.* 2014;33(8):823–41. DOI: https://doi.org/10.1002/embj.201387442
30. Rudenko L., Naykhin A., Donina S., et al. Assessment of immune responses to H5N1 inactivated influenza vaccine among individuals previously primed with H5N2 live attenuated influenza vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; 11(12): 2839–48. DOI: https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1069931
31. Talaat K.R., Luke C.J., Khurana S., et al. 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. DOI: https://doi.org/10.1093/infdis/jiu123

Информация об авторах

Матюшенко Виктория Аркадьевна✉ — н. с. лаб. иммунологии и вакцинопрофилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, matyshenko@iemspb.ru, https://orcid.org/0000-0002-4698-6085

Костромитина Арина Дмитриевна — м. н. с. лаб. клеточной иммунологии отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, arina8goshina@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-5432-0171

Руденко Лариса Георгиевна — д-р мед. наук, профессор, рук. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, vaccine@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0107-9959

Исакова-Сивак Ирина Николаевна — д-р биол. наук, член-корр. РАН, зав. лаб. иммунологии и вакцинопрофилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, isakova.sivak@iemspb.ru, https://orcid.org/0000-0002-2801-1508

Участие авторов: *Матюшенко В.А.* — идея и разработка концепции статьи, подготовка и проведение вирусологических и иммунологических исследований, анализ данных мировой литературы, подготовка текста статьи; *Костромитина А.Д.* — подготовка и проведение иммунологических исследований вакцинных препаратов; *Руденко Л.Г.* — идея и разработка концепции статьи, написание текста статьи, окончательное утверждение версии для публикации; *Исакова-Сивак И.Н.* — идея и разработка концепции статьи, общее руководство проектом, написание статьи, научное редактирование статьи, окончательное утверждение версии для публикации.

Статья поступила в редакцию 20.10.2024;
принята к публикации 28.12.2024;
опубликована 28.02.2025

Information about the authors

Victoria A. Matyushenko✉ — researcher, Laboratory of immunology and vaccine prevention of viral infections, Department of virology named after A.A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, matyshenko@iemspb.ru, https://orcid.org/0000-0002-4698-6085

Arina D. Kostromitina — junior researcher, Laboratory of cellular immunology, Department of immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, arina8goshina@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-5432-0171

Larisa G. Rudenko — MD, PhD, Professor, Head of the Department of virology named after A.A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, vaccine@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0107-9959

Irina N. Isakova-Sivak — Dr. Sci. (Biol.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of immunology and vaccine prevention of viral infections, Department of virology named after A.A. Smorodintsev, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, isakova.sivak@iemspb.ru, https://orcid.org/0000-0002-2801-1508

Authors' contribution: *Matyushenko V.A.* — idea and development of the article concept, preparation and implementation of virological and immunological studies, analysis of world literature data, preparation of the article text; *Kostromitina A.D.* — preparation and implementation of immunological studies of vaccine preparations; *Rudenko L.G.* — idea and development of the article concept, writing the article text, final approval of the version for publication; *Isakova-Sivak I.N.* — idea and development of the article concept, general management of the project, writing the article, scientific editing of the article, final approval of the version for publication.

The article was submitted 20.10.2024;
accepted for publication 28.12.2024;
published 28.02.2025