



Изучение роли иммунитета к нейраминидазе вируса гриппа в защите от вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции у мышей

Ленева И.А.✉, Фалынскова И.Н., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Поддубиков А.В., Свитич О.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия

Введение. Пневмония является наиболее частым осложнением после гриппозной инфекции, с которым ассоциированы тяжелые случаи заболеваний и смертельные исходы во время сезонных и пандемических вспышек гриппа. Ранее мы показали, что вакцинирование мышей вирусоподобными частицами (ВПЧ), несущими гемагглютинин (НА) вируса гриппа, снижает смертность, вызванную бактериальными инфекциями после перенесенной гриппозной инфекции у мышей.

Цель данной работы — изучение возможности усиления защитного эффекта ВПЧ при дополнении их нейраминидазой (НА) вируса гриппа.

Материалы и методы. Изучали влияние Gag-ВПЧ, несущих НА или NA вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34, отдельно или в комбинации на модели вторичной бактериальной инфекции, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции гомологичным или гетерологичным вакцине вирусами гриппа.

Результаты. Коктейль НА-Gag-ВПЧ 100 нг + NA-Gag-ВПЧ 20 нг полностью предотвращал смертность, потерю веса и репликацию вируса, а также значительно снижал размножение бактерий в легких животных, зараженных гомологичным вирусом гриппа. Иммунизация этим же коктейлем защищала 60% животных от смертности, снижала потерю их веса и ингибировала размножение патогенов в легких животных с вторичной бактериальной инфекцией *S. aureus* после гриппозной инфекции гетерологичным вирусом гриппа H1N1, несмотря на отсутствие антител, ингибирующих НА и NA этого вируса.

Заключение. Наши результаты показывают, что парентеральная вакцинация ВПЧ, содержащими НА и NA, может улучшить исход вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после гриппа, даже если вирус антигенно отличается от вакцинного штамма. При этом в нашей модели иммунитет к НА вируса гриппа имел превалирующее значение.

Ключевые слова: вирус гриппа; *Staphylococcus aureus*; вирусоподобные частицы; вторичные бактериальные пневмонии после гриппозной инфекции.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-45-05002 «Вирусоподобные частицы для борьбы с постгриппозными бактериальными инфекциями, 2018–2020 гг.»).

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

Для цитирования: Ленева И.А., Фалынскова И.Н., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Поддубиков А.В., Свитич О.А. Изучение роли иммунитета к нейраминидазе вируса гриппа в защите от вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции у мышей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(6): 564–577.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-7>

Поступила 02.11.2020

Принята в печать 21.12.2020

The study of neuraminidase immunity in protection against secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection in mice

Irina A. Leneva✉, Irina N. Falynskova, Nadezhda P. Kartashova, Ekaterina A. Glubokova, Aleksandr V. Poddubikov, Oksana A. Svitich

I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

Introduction. Pneumonia often occurs secondary to influenza infection and accounts for a large proportion of the morbidity and mortality associated with seasonal and pandemic influenza outbreaks. We previously have shown that vaccination with Virus-like particles (VLPs) containing hemagglutinin (HA) of influenza virus reduces mortality

caused by bacterial infections after an influenza infections in mice. The **aim** of this work is to study whether this protective effect may be potentiated by supplementing the HA preparation with the influenza neuraminidase (NA). **Materials and methods.** We studied the effect of Gag-VLPs with the influenza HA or NA from A/PR/8/34 alone or in combination, in a lethal BALB/c mouse model of *S. aureus* infection after vaccine-matched or mismatched influenza virus challenge.

Results. A cocktail of HA-Gag and NA-Gag-VLPs fully protected from weight loss, mortality and viral replication and significantly reduced the bacterial burden in the lungs of A/PR/8/34 infected animals. Immunization with this cocktail HA-Gag-VLPs 100 ng + NA-Gag-VLPs 20 ng also protected 60% of animals from mortality associated with secondary bacterial *S. aureus* infection following a heterologous H1N1 influenza virus challenge, and led to the significant protection from weight loss and pulmonary pathogen replication even in the absence of HA-inhibition and NA-inhibition antibodies.

Conclusion. Our results indicate that influenza vaccination may improve the outcome of a secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza even when the virus is antigenically different from the vaccine strain. At the same time, in our model, the significance of the immunity to influenza virus HA was prevalent.

Keywords: *influenza virus; Staphylococcus aureus; VLP; secondary bacterial pneumonia after influenza infection.*

Acknowledgments. This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 18-45-05002 «Virus-like particles for the fight against post-influenza bacterial infections, 2018–2020»).

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

For citation: Leneva I.A., Falynskova I.N., Kartashova N.P., Glubokova E.A., Poddubikov A.V., Svitich O.A. The study of neuraminidase immunity in protection against secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection in mice. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(6): 564–577. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-7>

Received 2 November 2020

Accepted 21 December 2020

Введение

Большая часть смертельных исходов от гриппа обусловлена вторичными бактериальными осложнениями, среди которых ведущую роль занимают пневмонии. Смертность от вторичных пневмоний после гриппа ассоциирована с определенной группой бактерий, включающей *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pyogenes* [1–3]. Случаи развития постгриппозных бактериальных пневмоний особенно часто встречаются во время гриппозных пандемий [4], когда у большинства людей отсутствует иммунитет к новому штамму вируса гриппа (ВГ). Известно, что бактериальная суперинфекция, этиологическим агентом которой в большинстве случаев являлся *S. pneumoniae*, была основной причиной смертности во время пандемии «испанского гриппа» в 1918–1919 гг. Однако в пандемии 1957 и 1968 гг. преобладающим этиологическим агентом вторичных бактериальных пневмоний уже являлся *S. aureus* [5]. Также во время пандемии 2009 г. в США было показано, что 77 смертей в период с мая по август 2009 г. сопровождалась бактериальными инфекциями почти в 30% случаев, 46% из которых были вызваны *S. pneumoniae*, 9% — *S. aureus* и 1% — *H. influenzae*. G. Palacios и соавт. (2009) исследовали образцы носоглоточных мазков почти у 200 больных пандемическим гриппом: *H. influenzae* была найдена в 52% образцов, *S. pneumoniae* — в 31%, *S. aureus* — в 18% [6]. В исследовании на контингенте 838 больных детей с тяжелым течением инфекции в США было показано, что в течение 72 ч после попадания в отделение интенсивной

терапии у 33% детей развивалась бактериальная суперинфекция, в 26% случаев вызванная *S. aureus*, в 5,5% — *S. pneumoniae* и в 5% — *H. influenzae* [7]. Бактериемии наблюдались в 5% случаев, главной причиной для них послужил *S. aureus* [7]. Следует подчеркнуть, что почти половина *S. aureus* были представлены формами, резистентными к метициллину. В отношении *S. aureus* процесс создания вакцины далек от завершения [8], кроме того, все более широкое распространение мультирезистентных штаммов стафилококка делает применение антибиотиков неэффективным [9, 10].

Вторичная бактериальная инфекция провоцируется гриппозной инфекцией за счет нарушения механизмов антибактериальной защиты организма [11–13]. Показано, что инактивированные гриппозные вакцины являются эффективным средством предотвращения вторичных бактериальных осложнений при условии использования вакцины, специфичной к вирусному штамму и вызывающей образование нейтрализующего антительного ответа [14–16]. Однако постоянный антигенный дрейф циркулирующих ВГ создает повторяющуюся ситуацию несовпадения антигенных свойств вакцины и штаммов вируса, что снижает или нивелирует эффективность сезонных вакцин. Результаты метаанализа клинических исследований на протяжении 47 сезонов показывают эффективность инактивированных гриппозных вакцин у взрослых людей на уровне 54–73% даже в случае антигенного соответствия препарата [17], однако этот показатель резко снижается при антигенном несоответствии вакцины [17] или в случае вакцинации пожилых людей [18, 19].

Многочисленные исследования позволяют предполагать, что ведущую роль в предотвращении развития гриппозной инфекции играют нейтрализующие антитела к гемагглютинуину (НА) вируса гриппа [20]. В случае несовпадения вакцинного штамма с циркулирующим наблюдается отсутствие адекватной защиты от первичной инфекции, что может приводить к незащищенности вакцинированных от бактериальных осложнений [17]. Нами ранее на экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. pneumoniae* или *S. aureus* после гриппозной инфекции, показано, что вакцинация вирусоподобными частицами (ВПЧ), несущими НА ВГ, обеспечивает защиту от бактериальных суперинфекций после гриппозной инфекции, инициированной гомологичным, но не гетерологичным ВГ [21, 22].

Целью настоящей работы являлось изучение роли иммунного ответа к белку ВГ — нейраминидазе (НА) в формировании резистентности к вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции. Для иммунизации мышей были использованы ВПЧ, несущие НА в качестве самостоятельного антигена, или их комбинация с ВПЧ, экспрессирующими НА ВГ. С целью провокации вторичной бактериальной инфекции использовали ВГ, отличный по антигенным свойствам от вируса, входящего в состав ВПЧ, что имитировало ситуацию несовпадения циркулирующих штаммов с вакцинными, имеющую место в природе.

Материалы и методы

Вирусоподобные частицы

Препараты ВПЧ, образованные комбинацией ретровирусного белка Gag с белками ВГ А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), полученные с помощью конструирования бакуловирусного вектора, экспрессирующего ВПЧ при заражении клеток насекомых (Tnms42-клетки), были предоставлены М. Klausberger (Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Вена). НА-Gag-ВПЧ содержали НА ВГ А/PR/8/34 (100 нг/0,2 мл), НА-Gag-ВПЧ — НА ВГ А/PR/8/34 (20 нг/0,2 мл), и Gag-ВПЧ («пустышки») не содержали белков ВГ.

Патогены

В опытах использовали ВГ, полученные из музея ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»: А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) (далее А/PR/8/34) и реассортант NIBRG-121xp (А/Калифорния/04/2009 (pdm2009 H1N1 2009) × А/PR/8/34 (H1N1) (2 : 6)), содержащий поверхностные белки НА и NA от вируса А/Калифорния/04/2009, а внутренние белки — от А/PR/8/34. Вирусы для заражения выращивали в 9-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) в течение 48 ч при 37°C. После определения инфекционной активности вирусов путем титро-

вания в РКЭ их использовали для инфицирования животных.

Для бактериального заражения использовали штамм *S. aureus* № 884, выделенный от пациента и полученный из Коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова в лиофилизированном состоянии. Для получения живой культуры ампулу в стерильных условиях вскрывали и добавляли 1 мл питательного бульона (ФБУН ГНЦ ПМБ). Суспензию переносили в пробирку объемом 2 мл и инкубировали 4 ч при 37°C. Затем осуществляли посев на скошенный питательный агар (ФБУН ГНЦ ПМБ). Пробирки с культурой инкубировали в течение 18 ч при 37°C, по стандарту мутности определяли содержание бактерий в 1 мл объема и в этот же день использовали для заражения животных.

РКЭ и животные

РКЭ получали из ООО «Майские просторы», Московская область. В исследованиях использовали мышей-самок линии BALB/c массой 12–14 г (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Филиал «Андреевка», Московская область). Содержание и манипуляции с животными соответствовали Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных¹.

Определение эффекта вакцинации в модели бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции

Мышей рандомизированно распределяли по группам и иммунизировали внутривентриально в объеме 0,2 мл как коктейлем НА-Gag-ВПЧ + НА-Gag-ВПЧ с различным, включая увеличенное, содержанием в нем НА-Gag-ВПЧ, так и каждым компонентом по отдельности (НА-Gag-ВПЧ и НА-Gag-ВПЧ). Коктейли ВПЧ готовили, смешивая два вида частиц непосредственно перед введением. Содержание белков в 0,2 мл препаратов (на одну мышь): НА-Gag-ВПЧ 100 нг, НА-Gag-ВПЧ 20 нг, коктейль НА-Gag-ВПЧ 100 нг + НА-Gag-ВПЧ 0,8 нг, коктейль НА-Gag-ВПЧ 100 нг + НА-Gag-ВПЧ 4 нг, коктейль НА-Gag-ВПЧ 100 нг + НА-Gag-ВПЧ 20 нг. Кроме того, группа животных одновременно с вакцинацией была инфицирована содержащей ВГ А/PR/8/34 аллантаоисной жидкостью интраназально под легким наркозом (0,03 мл, 0,5 МЛД₅₀/мл). Животным контрольных групп вместо препаратов ВПЧ вводили по 0,2 мл стерильного 20 мМ НЕРЕС в соответствующие контролю сроки.

На 21-е сутки после иммунизации 3 мыши в каждой из изучаемых групп были гуманно умерщвлены и у них отобраны пробы крови для определения

¹ Приказ Минздрава России от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации».

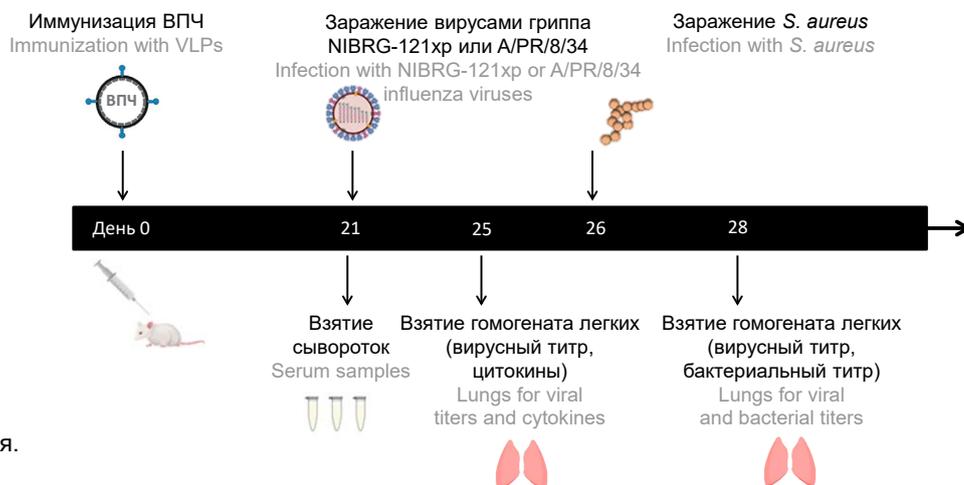


Рис. 1. Дизайн исследования.
Fig. 1. Study design.

антигенной активности в реакции торможения гем-агглютинации (РТГА) и иммуноферментного анализа (ИФА), которые были проведены после подготовки новых полученных сывороток крови. В этот же день мышей инфицировали интраназально под эфирным наркозом соответствующей вирусосодержащей аллантоисной жидкостью (объем 0,03 мл, по 0,5 МЛД₅₀/мл).

На 4-е сутки после заражения 5 животных из каждой группы гуманно умерщвляли, у них забирали легкие для определения инфекционного титра вируса. На 5-е сутки после вирусного заражения оставшихся мышей инфицировали в объеме 0,03 мл интраназально под эфирным наркозом *S. aureus*.

На 8-е и 3-и сутки после вирусного и бактериального заражения соответственно у 5 животных из каждой группы забирали легкие для определения инфекционного титра вируса (путем титрования гомогенатов тканей легких на РКЭ) и бактериальной обсемененности. Наблюдение за животными проводили в течение 21 дня после вирусного заражения (рис. 1). Оценку протективной активности ВПЧ проводили, учитывая защиту ими животных от смертности и потери массы тела. Изменение массы тела рассчитывали отдельно для каждой мыши и выражали в процентах, принимая за 100% массу тела животного перед инфицированием. Для мышей каждой группы определяли среднее значение процента изменения массы тела.

Определение антигенной активности ВПЧ

Для оценки антигенной активности в отношении НА вируса гриппа в сыворотках крови определяли титры сывороточных антигемагглютинирующих антител в РТГА с 4 агглютинирующими единицами соответствующего вирусного антигена по стандартной методике².

² WHO manual. URL: <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf>

Для обнаружения антител к НА использовали два метода. Первый метод основан на использовании низкомолекулярного субстрата MUNANA. К двукратным разведениям подготовленных сывороток (50 мкл), помещенным в 96-луночные планшеты с плоским дном для измерения флуоресценции («FluoroNunc»), добавляли предварительно определенные рабочие разведения NA-Gag-ВПЧ (50 мкл, 1 : 1024). Далее реакцию проводили, как описано ранее [23]. Кроме того, в сыворотках крови определяли титры вирусспецифических иммуноглобулинов классов А и G при помощи ИФА. В качестве антигенов использовали препарат очищенного рекомбинантного белка НА ВГ А/PR/8/34, содержащий НА в концентрации 1 мг/мл, или препарат очищенного рекомбинантного белка НА ВГ А/PR/8/34, содержащий НА в концентрации 2 мг/мл, сорбированные на 96-луночные планшеты с плоским дном («Thermo Fisher») в течение ночи при 4°C. После отмывки планшетов (3 раза, 300 мкл ФСБ-Tween) были добавлены серийные 1 : 2 разведения изучаемых сывороток (100 мкл), после инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре и отмывки планшетов (3 раза, 300 мкл ФСБ-Tween) в каждую лунку планшета помещали 50 мкл меченого пероксидазой конъюгата в разведении 1 : 3000 (#A2304, «Sigma»). После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре и 3-кратной отмывки планшеты были обработаны 100 мкл субстрата SIGMAFAST™ OPD («Sigma»), реакция была остановлена 25 мкл 3 М H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при λ = 490 нм на спектрофотометре «Tecan Infinite M1000 Microplate Reader» («Tecan»).

Определение инфекционного титра вируса в лёгких мышей

Для определения титра вируса готовили 10-кратные разведения суспензии легких мышей на среде Игла MEM и вводили по 100 мкл каж-

дого разведения в аллантоисную полость 9-дневных РКЭ. Инфицированные РКЭ инкубировали во влажной среде при 37°C в течение 48 ч, затем охлаждали при 4°C в течение 4 ч. Отбирали 50 мкл аллантоисной жидкости, помещали в лунки круглодонного 96-луночного планшета и добавляли 50 мкл 0,5% суспензии куриных эритроцитов. Через 45 мин инкубации по реакции гемагглютинации определяли, в каких РКЭ размножился вирус, и рассчитывали ЭИД₅₀.

Определение обсемененности респираторных путей

Для определения бактериальной обсемененности из полученных образцов гомогенизированных легких готовили серийные разведения и осуществляли прямой высеv на чашки Петри с агаром Мюллера–Хинтона. Учет колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили после 18 ч инкубации при 37°C. Количество выросших колоний умножали на степень разведения и коэффициент, обратный количеству посеянного материала, и вырожали в Ig КОЕ/мл.

Результаты

Определение антигенной активности препаратов ВПЧ

При изучении иммунного ответа после однократной иммунизации мышей препаратами НА-Gag-ВПЧ 100 нг, НА-Gag-ВПЧ или их комбинацией, взятыми в различных соотношениях (НА-Gag-ВПЧ 20, 4 или 0,8 нг), в сыворотке крови в РТГА (функциональные антитела) были выявлены различные титры антител к гомологичному вирусу А/PR/8/34 (H1N1). Наивысшие титры обнаруживались в группе мышей, иммунизированных монопрепаратом НА-Gag-ВПЧ. Иммунизация коктейлем с НА-антигеном приводила к снижению титра антигемагглютинирующих антител (табл. 1). В то же время данные ИФА показали близкие по значению показатели IgG-ответа к НА во всех группах. У животных, зараженных сублетальной дозой вируса А/PR/8/34 (H1N1), титры РТГА превосходили показатели в группах, иммунизированных ВПЧ. Ни в одной из экспериментальных групп в РТГА не выявлено антител к гетерологичному штамму NIBRG-121 (H1N1) (табл. 1). Определение иммунного ответа к НА гомологичного вируса А/PR/8/34 (H1N1) путем реакции ингибирования нейраминидазной ферментативной активности с использованием низкомолекулярного субстрата MUNANA не выявило индукцию антител к НА ни в одной из групп, что совпадает с данными исследователей о возможности использования этого субстрата только для выявления моноклональных антител [24]. Использование высокомолекулярного суб-

страта в ELISA позволило выявить в сыворотке крови антитела к НА только у животных, вакцинированных НА-Gag-ВПЧ, а также у животных, зараженных сублетальной дозой вируса А/PR/8/34 (H1N1). При использовании коктейля ВПЧ с НА- и НА-антигенами индукция антител к НА не была выявлена, а увеличение содержания НА-Gag-ВПЧ в коктейле не приводило к обнаружению антител, специфичных к НА, в ферментативном тесте при использовании субстрата ELISA.

Протективная эффективность ВПЧ при индукции инфекции гомологичным и гетерологичным вирусами

Для изучения эффекта ВПЧ, содержащих НА и НА, а также их коктейля с различным, включая увеличенное, содержанием в нем НА-Gag-ВПЧ на модели вторичной бактериальной пневмонии, вызванной *S. aureus*, для индукции гриппозной инфекции было использовано заражение как гомологичным А/PR/8/34, так и гетерологичным NIBRG-121хр ВГ. В группах невакцинированных животных, инфицированных соответствующими вирусами и бактериями (отрицательные контроли, 20 мМ HEPES + NIBRG-121хр + *S. aureus*; 20 мМ HEPES + А/PR/8/34 + *S. aureus*), наблюдалась полная гибель животных при большой потере веса, при этом размножение вируса и бактерий в легких было самым высоким среди всех изученных групп (табл. 2, 3, рис. 2, 3).

При вакцинации Gag-ВПЧ, не содержащими вирусных белков, смертность незначительно отличалась от таковой в группах отрицательного контроля и составляла 80% при инфекции обоими вирусами. Также титры вируса и концентрация бактерий в легких не отличались практически от таковых в группах невакцинированных животных (табл. 2, 3, рис. 2, 3). Общая гибель с большой потерей веса наблюдалась при вакцинации ВПЧ, содержащими только НА А/PR/8/34 (НА-Gag-ВПЧ), при последующем заражении гетерологичным вирусом NIBRG-121хр и бактериальным патогеном. Несмотря на заражение гетерологичным вирусом, вакцинация ВПЧ, содержащими только НА А/PR/8/34 (НА-Gag-ВПЧ), защищала 40% животных от гибели, снижала потерю их веса и размножение вируса и бактерий в легких при последующем заражении *S. aureus*. При инфекции вирусом NIBRG-121хр коктейль ВПЧ с низким содержанием НА (НА-Gag-ВПЧ + НА-Gag-ВПЧ, 0,8 нг) защищал только 30% животных. Увеличение содержания частиц с НА (НА-Gag-ВПЧ + НА-Gag-ВПЧ 20 нг) в коктейле приводило к повышению выживаемости животных до 60%. В этой группе защитный эффект был сравним с таковым у мышей, иммунизированных сублетальной дозой А/PR/8/34 с дальнейшей инфекцией NIBRG-121

Таблица 1. Изучение антигенной активности ВПЧ (вирусоподобных частиц) с HA-Gag-ВПЧ и NA-Gag-ВПЧ, а также коктейля HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ после вакцинации

Table 1. Study of the antigenic activity of HA-Gag-VLPs and NA-Gag-VLPs, as well as their cocktail (HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs) after vaccination

Группа Group	Антитела к HA Antibodies to HA		Антитела к NA Antibodies to NA		
	РТГА reaction of inhibition of hemagglutination		ИФА ELISA	ингибирование активности NA inhibition of neuraminidase activity	
	APR/8/34 (H1N1)	NIBRG-121xp (H1N1)	M	MUNANA	
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 0.8 нг HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 0.8 ng	< 10, 20, 10, < 10	< 10, < 10, < 20, < 10	800	< 10, < 10, < 10, < 10, < 10, < 10	350
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 4 нг HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 4 ng	20, < 10, < 10, 10	< 10, < 10, < 10, < 10	650	< 10, < 10, < 10, < 10, < 10, < 10	500
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng	40, 20, 40, 20	< 10, < 10, < 10, < 10	450	< 10, < 10, < 10, < 10, < 10, < 10	900
HA-Gag-ВПЧ HA-Gag-VLPs	40, 80, 40, 80	< 10, < 20, < 10, < 10	425	< 10, < 10, < 10, < 10, < 10, < 10	175
NA-Gag-ВПЧ 20 нг NA-Gag-VLPs 20 ng	10, 10, 10, 10	< 10, < 10, < 10, < 10	200	< 10, < 10, < 10, < 10, < 10, < 10	881
Сублетальная доза APR/8/34 Sublethal APR/8/34	80, 160, 160, 160	< 10, < 10, 20, < 20	800	< 10, < 10, < 10, < 10, < 10, < 10	530
Gag-ВПЧ Gag-VLPs	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10	50	< 10, < 10, < 10, < 10, < 10, < 10	Не определяли Did not determine
20 мМ HEPES (контроль) 20 mM HEPES (control)	< 10, < 10, < 10, < 10	< 10, < 10, < 10, < 10	50	< 10, < 10, < 10, < 10, < 10, < 10	150

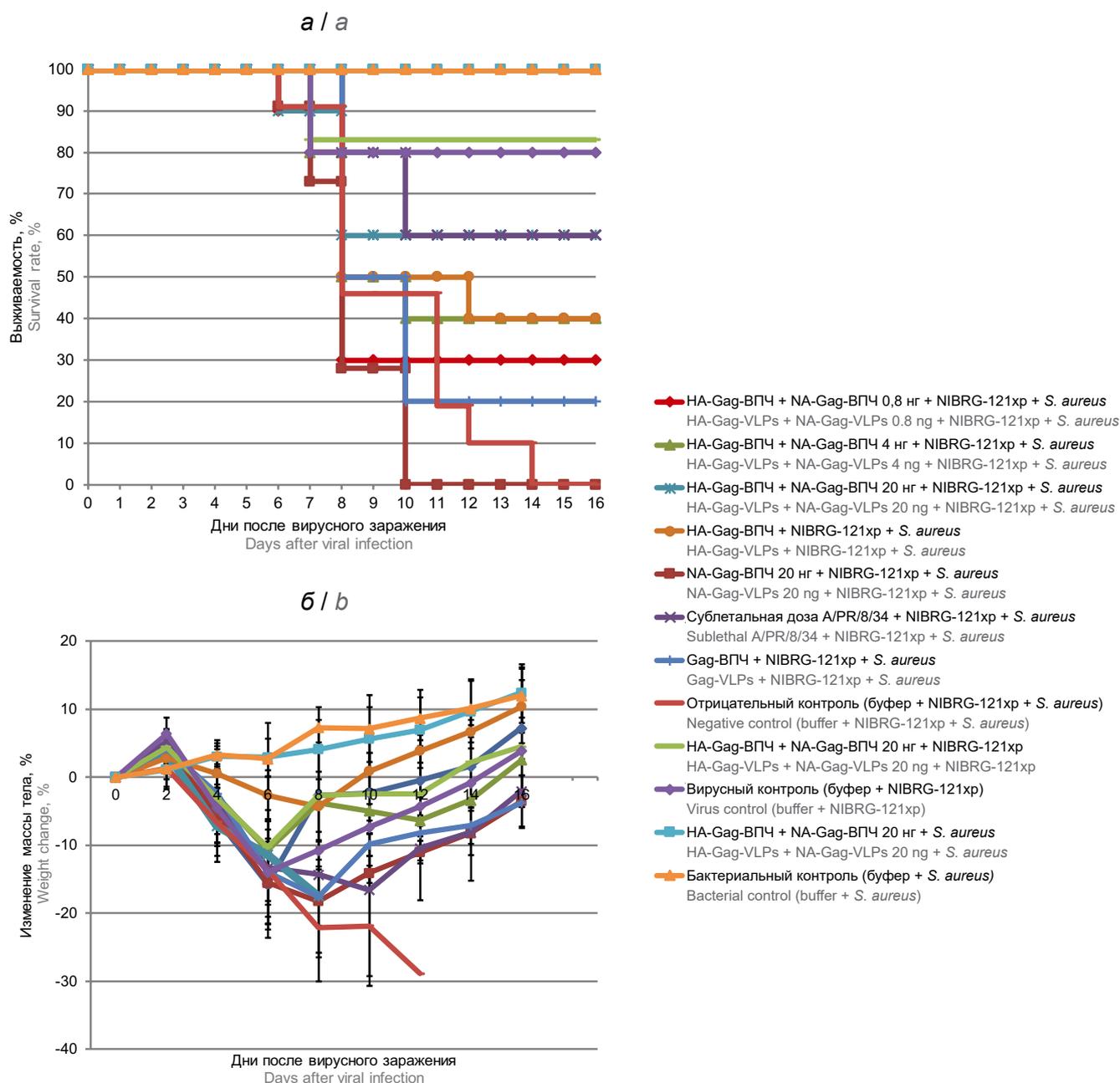


Рис. 2. Влияние вакцинации коктейлем HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ в разных дозах и каждым компонентом коктейля в отдельности на выживаемость (а) и изменение веса (б) животных на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции гетерологичным NIBRG-121xp (H1N1) ВГ.

Fig. 2. The effect of vaccination with the HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs cocktail at different doses and each cocktail component separately on survival (a) and weight change (b) of animals in a model of secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection with heterologous NIBRG-121xp (H1N1) influenza virus.

с последующим заражением *S. aureus* (табл. 2, рис. 2). В группе положительного контроля после вирусной инфекции при заражении гомологичным вирусом A/PR/8/34 (H1N1) с последующей супер-инфекцией *S. aureus* вакцинирование этим же коктейлем ВПЧ полностью предотвращало гибель мышей, потерю их веса и размножение вируса в легких на 4-е и 7-е сутки (табл. 3, рис. 3).

Исследование интерференового профиля в легких мышей в период перед проведением бактериального заражения

Известно, что выработка интерферонов и активация Th1-лимфоцитов и клеточных компонентов адаптивного иммунитета при вирусной инфекции может способствовать ослаблению ряда механизмов, участвующих в антибактериальном иммунитете.

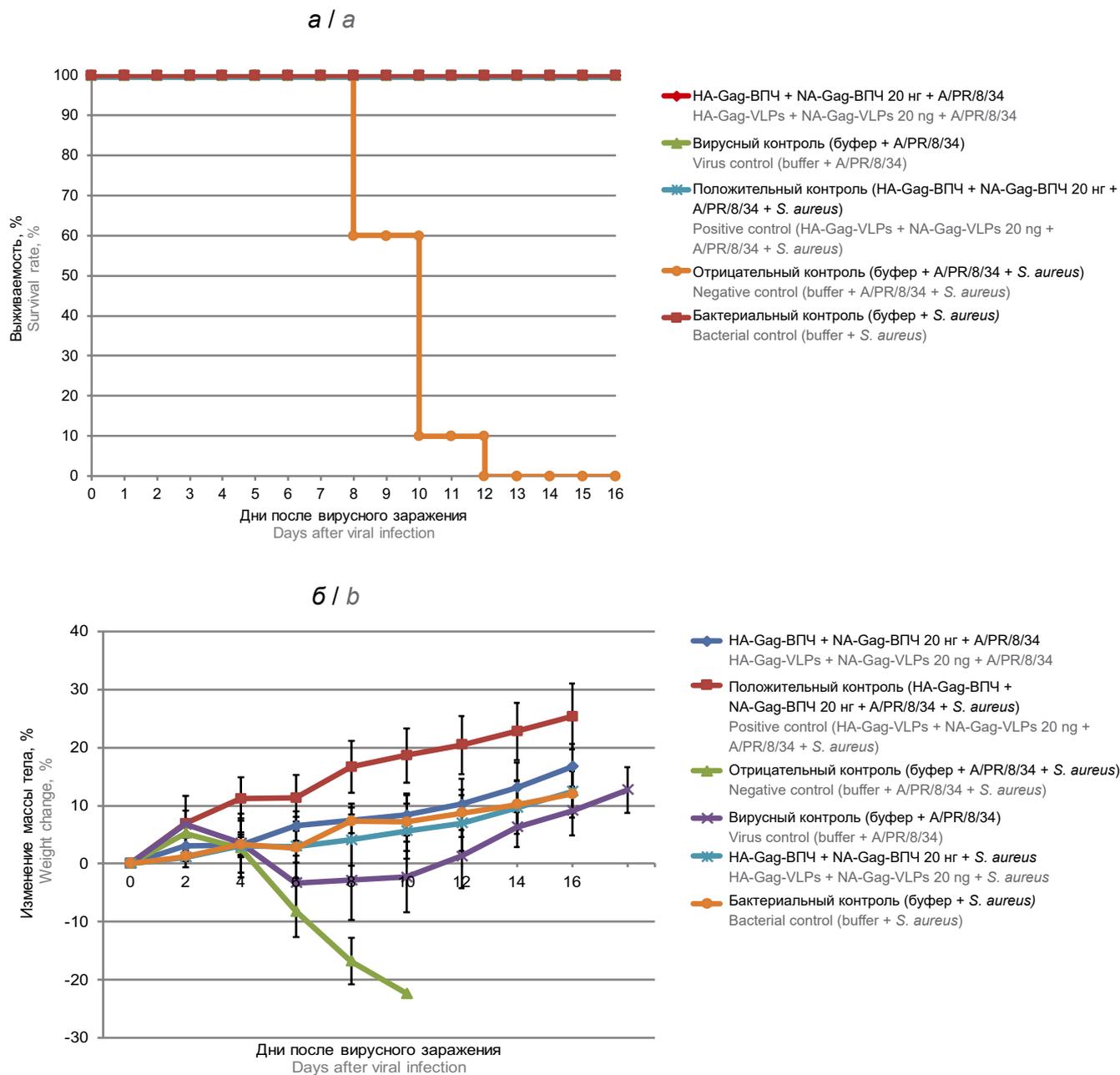


Рис. 3. Влияние вакцинации коктейлем ВПЧ (HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ) в разных дозах и каждым компонентом коктейля в отдельности на выживаемость (а) и изменение веса (б) животных на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции гомологичным A/PR/8/34 (H1N1) ВГ.

Fig. 3. The effect of vaccination with the HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs cocktail at different doses and each cocktail component separately on survival (a) and weight change (b) of animals in a model of secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection with homologous A/PR/8/34 (H1N1) influenza virus.

те, и являться триггером вторичной бактериальной инфекции. В связи с этим было изучено влияние иммунизации мышей ВПЧ, содержащими HA или NA, а также их комбинациями на выработку интерферонов- α , - β и - γ в легких мышей после вирусного заражения, перед проведением бактериального заражения (рис. 4). В качестве альтернативной группы сравнения были использованы мыши с постинфекционным иммунитетом после заражения субле-

тальной дозой вируса A/PR/8/34. Было показано, что иммунизация препаратом HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг снижает до минимума выработку интерферонов I типа при заражении гомологичным вирусным штаммом, обеспечивая подавление репродукции вируса. В то же время при гетерологичном заражении ни один из вакцинных препаратов достоверно не снижал выработку интерферонов по сравнению с группой неиммунизированных живот-

Таблица 2. Изучение вирусологических частиц с HA-Gag-ВПЧ и NA-Gag-ВПЧ, а также их коктейля разного состава на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции гетерологичным вирусом NIBRG-121xp (H1N1)
Table 2. Study of HA-Gag-VLPs, NA-Gag-VLPs, as well as their cocktail of different composition on the model of secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection with a heterologous virus NIBRG-121xp (H1N1)

Группа Group	Выживаемость Survival		Средняя продолжительность жизни, сут Mean day to death, days	Титр вируса в легких животных, Ig ЭИД _{50,0,1} /мл Lung viral titer, Ig EID _{50,0,1} ml		Плотность бактерий в легких животных, log КОЕ/мл, 7-е сутки после вирусной инфекции Bacterial density, Ig CFU/ml, 7 days after viral infection
	выжившие/общее число survival/total	выживаемость, % survival rate, %		4-е сутки после инфекции day 4 after viral infection	7-е сутки после инфекции day 7 after viral infection	
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 0,8 нг + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 0.8 ng + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	3/10 (<i>p</i> = 0,065169)	30	10,6	5,37 ± 0,47	6,2 ± 0,44	4,66 ± 0,54
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 4 нг + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 4 ng + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	4/10 (<i>p</i> = 0,024770)	40	12,2	5,5 ± 0,58	6,4 ± 1,14	3,46 ± 1,94
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	6/10 (<i>p</i> = 0,001735)	60	14,6	4,25 ± 0,5	5 ± 1	1,00 ± 1,41
HA-Gag-ВПЧ + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> HA-Gag-VLPs + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	4/10 (<i>p</i> = 0,024770)	40	12,6	4,75 ± 0,96	7 ± 1	1,84 ± 1,68
NA-Gag-ВПЧ 20 нг + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> NA-Gag-VLPs 20 ng + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	0/11	0	7,1	6,25 ± 0,5	6,2 ± 0,45	4,26 ± 0,68
Сублетальная доза A/PR/8/34 + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> Sublethal A/PR/8/34 + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	6/10 (<i>p</i> = 0,001735)	60	15,2	3 ± 0,82	1,9 ± 0,22	1,94 ± 1,78
Gag-ВПЧ + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i> Gag-VLPs + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	2/10 (<i>p</i> = 0,150950)	20	10,2	6,75 ± 0,5	7,6 ± 0,89	5,54 ± 0,96
Отрицательный контроль (буфер + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>) Negative control (buffer + NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>)	0/11	0	8,5	6,5 ± 0,58	7,8 ± 0,45	5,62 ± 0,53
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + NIBRG-121xp HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + NIBRG-121xp	5/6 (<i>p</i> = 0,000012)	83	17,6	4,25 ± 0,5	2,8 ± 0,84	—
Вирусный контроль (буфер + NIBRG-121xp) Virus control (buffer + NIBRG-121xp)	4/5 (<i>p</i> = 0,000053)	80	17,2	6,5 ± 0,58	2,6 ± 0,55	—
Бактериальный контроль (буфер + <i>S. aureus</i>) Bacterial control (buffer + <i>S. aureus</i>)	5/5	100	> 16	—	—	1,74 ± 1,24

Примечание. *p* < 0,05 рассматривается как достоверное отличие от контроля.
 Note. *p* < 0.05 is considered as a significant difference from control.

Таблица 3. Изучение вирусоподобных частиц с HA-Gag-ВПЧ и NA-Gag-ВПЧ, а также их коктейля разного состава на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции гомологичным вирусом A/PR/8/34 (H1N1)
Table 3. Study of HA-Gag-VLPs, NA-Gag-VLPs, as well as their cocktail of different composition on the model of secondary bacterial pneumonia induced by *S. aureus* after influenza infection with the homologous virus A/PR/8/34 (H1N1)

Группа Group	Выживаемость Survival		Средняя продолжительность жизни, сут Mean day to death, days	Титр вируса в легких животных, lg ЭИД _{50,0,1} мл Lung viral titer, lg EID _{50,0,1} ml		Плотность бактерий в легких животных, log КОЕ/мл, 7-е сутки после вирусной инфекции Bacterial density, lg CFU/ml, 7 days after viral infection
	выжившие/общее число survival/total	выживаемость, % survival rate, %		4-е сутки после инфекции day 4 after viral infection	7-е сутки после инфекции day 7 after viral infection	
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + A/PR/8/34 HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + A/PR/8/34	5/5	100	> 16	0	0	—
Вирусный контроль (буфер + A/PR/8/34) Virus control (buffer + A/PR/8/34)	5/5	100	> 16	5,25 ± 0,5	3,0 ± 0,7	—
HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + <i>S. aureus</i> HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + <i>S. aureus</i>	5/5	100	> 16	—	—	1,68 ± 1,56
Бактериальный контроль (буфер + <i>S. aureus</i>) Bacterial control (buffer + <i>S. aureus</i>)	5/5	100	> 16	—	—	1,74 ± 1,24
Положительный контроль (HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + A/PR/8/34 + <i>S. aureus</i>) Positive control (HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + A/PR/8/34 + <i>S. aureus</i>)	5/5	100	> 16	0	0	1,28 ± 1,76
Отрицательный контроль (буфер + A/PR/8/34 + <i>S. aureus</i>) Negative control (buffer + A/PR/8/34 + <i>S. aureus</i>)	0/10	0	8,4	5,25 ± 0,5	7,2 ± 0,84	7,28 ± 1,92

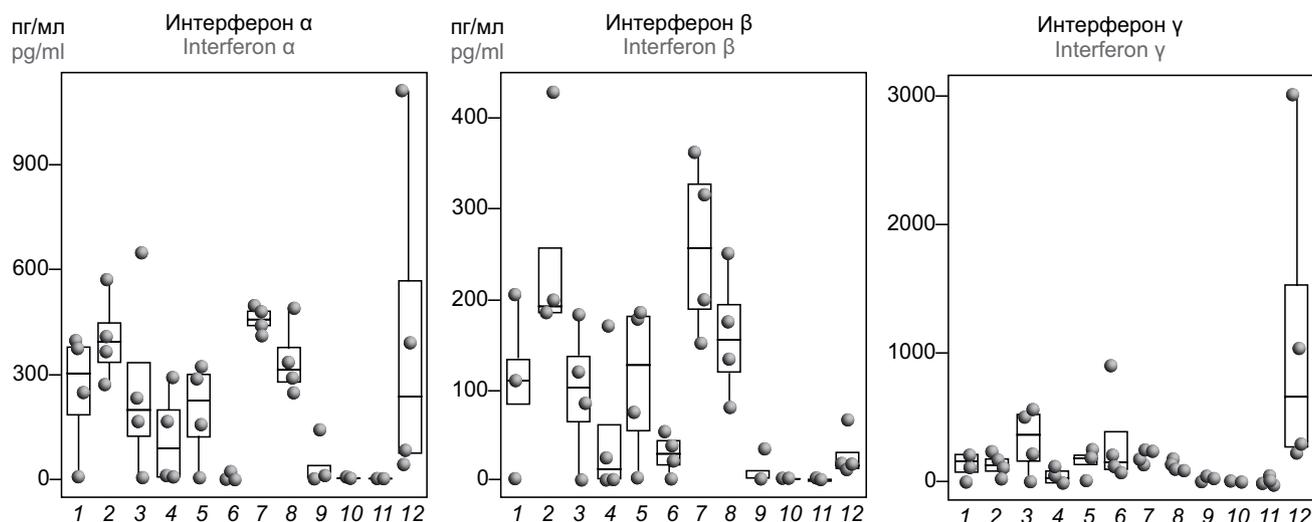


Рис. 4. Влияние вакцинации HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ в разных дозах и каждым компонентом коктейля в отдельности на индуцированную заражением вирусами гриппа экспрессию интерферонов I/II типов в легких мышей.

1 — HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 0,8 нг + NIBRG-121; 2 — HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 4 нг + NIBRG-121; 3 — HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + NIBRG-121; 4 — HA-Gag-ВПЧ + NIBRG-121; 5 — NA-Gag-ВПЧ 20 нг + NIBRG-121; 6 — сублетальная доза A/PR/8/34 + NIBRG-121; 7 — Gag-ВПЧ + NIBRG-121; 8 — буфер + NIBRG-121; 9 — HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг; 10 — HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг + A/PR/8/34; 11 — буфер (неинфицированные мыши); 12 — буфер + A/PR/8/34.

Fig. 4. The effect of vaccination with the HA-VLPs + NA-VLPs cocktail at different doses and each cocktail component separately on interferon (type I/II) expression in the lung of mice infected with influenza viruses.

1 — HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 0.8 ng + NIBRG-121; 2 — HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 4 ng + NIBRG-121; 3 — HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + NIBRG-121; 4 — HA-Gag-VLPs + NIBRG-121; 5 — NA-Gag-VLPs 20 ng + NIBRG-121; 6 — sublethal PR8 + NIBRG-121; 7 — Gag-VLPs + NIBRG-121; 8 — Buffer + NIBRG-121; 9 — HA-Gag-VLPs + NA-VLPs 20 ng; 10 — HA-Gag-VLPs + NA-Gag-VLPs 20 ng + A/PR/8/34; 11 — Buffer (uninfected mice); 12 — Buffer + A/PR/8/34.

ных. Единственным исключением являлась группа мышей с перенесённой гриппозной A/PR/8/34-инфекцией. Здесь наблюдалось снижение выработки интерферона- α до минимальных значений на фоне существенного снижения репродукции вируса в легких на 4-е сутки после заражения. Среди препаратов ВПЧ наименьшие показатели выработки интерферонов показал монопрепарат HA-Gag-ВПЧ (рис. 4). Таким образом, добавление нейраминидазного компонента в состав вакцинных препаратов не влияло на выработку интерферонов при заражении иммунизированных мышей гетерологичным штаммом ВГ.

Обсуждение

В настоящее время не существует вакцины для профилактики осложнений, вызванных *S. aureus*. При этом количество штаммов данного возбудителя, невосприимчивых к лечению антибиотиками, постоянно растет. Одной из профилактических стратегий борьбы с бактериальными пневмониями, стафилококковыми инфекциями и связанными с ними патологиями является вакцинация против гриппа. Ранее нами показано, что ВПЧ, несущие HA ВГ, полностью защищают животных от вторичных бактериальных пневмоний, индуцированных *S. aureus*, при условии первичной гриппозной инфекции, вызванной гомологичным вирусом [21]. Показано, что другие белки ВГ вовлечены в летальный синергизм вирус-бактериальных осложнений [25–27].

В частности, NA ВГ способствует бактериальной адсорбции на клетки эпителия путем модификации клеточных поверхностей и увеличения экспрессии рецепторов адгезии [24, 26]. В свете того, что современные противогриппозные вакцины стандартизованы исключительно на основе содержания HA, особый интерес представляла оценка того, как включение в состав ВПЧ, помимо HA, также и NA ВГ будет влиять на антигриппозный иммунитет для снижения вторичных бактериальных осложнений при несовпадении циркулирующих штаммов с вакцинными.

Проведенные эксперименты на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции, вызванной гетерологичным вирусом, показали, что ВПЧ с NA в отдельности не проявляют протективных свойств. Вакцинация коктейлем ВПЧ, содержащим HA и NA, повышала защиту животных от гибели и потери массы тела только при увеличенном содержании NA в коктейле ВПЧ (HA-Gag-ВПЧ + NA-Gag-ВПЧ 20 нг). Наши результаты совпадали с данными V. Zurli и соавт. [28], которые продемонстрировали значительную защиту от вторичной инфекции *S. aureus* после гетерологичной вирусной инфекции CAL09 при иммунизации субъединичной вакциной, содержащей HA и NA ВГ A/PR/8/34. Совокупность полученных нами результатов позволяет заключить, что иммунный ответ к HA имеет превалирующую

щее значение при защите от вторичной бактериальной суперинфекции, спровоцированной инфекцией гетерологичным по отношению к вакцинному препарату штаммом ВГ. Иммунный ответ только к НА не обеспечивал снижение летальности у животных, однако увеличение концентрации антигена НА в составе двухкомпонентной вакцины с НА способствовало достижению наивысших показателей снижения летальности при гетерологичном вирусном заражении.

Данные по протективной активности ВПЧ, полученные нами, отличались от данных по их антигенной активности. При иммунизации ВПЧ, содержащими коктейль НА и NA, в РТГА выявлено снижение количества антител к НА гомологичного вируса по сравнению с иммунизацией ВПЧ, содержащими только НА. Кроме того, в реакции антинейраминидазной активности мы наблюдали антитела к НА только при иммунизации ВПЧ, содержащими NA. Эти данные дают возможность предполагать, что добавление нейраминидазного компонента в вакцинный препарат может вызывать продукцию антител, интерферирующих с антителами, выявляемыми в реакции РТГА, а наличие анти-НА антител может ингибировать нейтрализующую активность NA-специфичных антител.

В то же время при изучении механизмов защиты и суррогатных маркеров чувствительности к вторичной бактериальной инфекции обнаружено, что показатели повреждения легких, предшествующие бактериальному заражению, лучше коррелируют с протективной активностью, чем титры антител к НА и NA, что, вероятно, обусловлено эффектом их взаимной интерференции, искажающей результаты изучения гуморального ответа к ВПЧ. Обогащение вакцинного препарата NA ведет к частичному улучшению его кросс-протективных свойств, но для достижения лучшего эффекта защиты, по-видимому, требуется включение в состав экспериментальной вакцины более высоких концентраций NA или включение в состав вакцинного препарата других консервативных антигенов ВГ, таких как белки PB1-f2 или NS1, обладающих иммунорегуляторными функциями.

При анализе интерфероновой реакции у вакцинированных мышей при гриппозной инфекции оказалось, что парентеральная иммунизация ВПЧ, экспрессирующими НА и NA, предотвращает выработку интерферонов I и II типов только при условии индукции нейтрализующих антител к гомологичному вирусу, но не оказывает влияния при инфекции гетерологичным вирусом. Влияние иммунизации антигеном NA на снижение концентрации интерферонов I типа в легких при инфекции NIBRG-121хр было недостоверным и не превалировало над эффектом, достигаемым при иммунизации ВПЧ, экспрессирующими

НА. Следует отметить, что индукция интерферонов при инфекции вирусом NIBRG-121хр была существенно ниже по сравнению с вирусом A/PR/8/34 (H1N1).

Важно отметить, что наивысшие титры антител к НА и NA гомологичного вируса и высокий протективный эффект при заражении гетерологичным вирусом наблюдались у мышей с постинфекционным иммунитетом в результате перенесенной инфекции вирулентным штаммом A/PR/8/34 (H1N1). Очевидно, что при отсутствии нейтрализующих антител данный эффект может быть связан с формированием Т-клеточного звена противовирусного иммунитета при естественной гриппозной инфекции. Известно, что респираторная инфекция или иммунизация живыми аттенуированными вакцинами способны формировать резидентные клетки памяти (T_hm), ассоциированные со слизистыми оболочками респираторного тракта, обладающие способностью обеспечивать кросс-протективную защиту в отношении гетерологичных ВГ [29]. Возможность индукции такого иммунитета с помощью ВПЧ при интраназальном введении требует дальнейшего изучения.

Заключение

Иммунный ответ к НА имеет превалирующее значение при защите от вторичной бактериальной суперинфекции, спровоцированной инфекцией гетерологичным по отношению к вакцинному препарату штаммом ВГ, иммунный ответ только к NA не обеспечивает снижение летальности у животных. В то же время обогащение ВПЧ NA приводит к частичному улучшению кросс-протективных свойств вакцинного препарата. По-видимому, для достижения лучшего эффекта защиты требуется включение в состав ВПЧ других, более консервативных антигенов ВГ, таких как PB1-f2- или NS1-белки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Joseph C., Togawa Y., Shindo N. Bacterial and viral infections associated with influenza. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2013; (7 Suppl. 2): 105–13. <https://doi.org/10.1111/irv.12089>.
2. Metersky M.L., Masterton R.G., Lode H., File T.M., Babinchak T. Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia complicating influenza. *Int. J. Infect. Dis.* 2012; 16(5): e321–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.01.003>
3. Metzger D.W., Sun K. Immune dysfunction and bacterial coinfections following influenza. *J. Immunol.* 2013; 191(5): 2047–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301152>
4. Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(7): 962–70. <https://doi.org/10.1086/591708>
5. Lindsay M.I., Herrmann E.C., Morrow G.W., Brown A.L. Hong Kong influenza: clinical, microbiologic, and pathologic features in 127 cases. *JAMA.* 1970; 214(10): 1825–32. <https://doi.org/10.1001/jama.1970.03180100019004>
6. Palacios G., Hornig M., Cisterna D., Savji N., Bussetti A.V., Kapoor V., et al. *Streptococcus pneumoniae* coinfection is cor-

- related with the severity of H1N1 pandemic influenza. *PLoS One*. 2009; 4(12): e8540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008540>
7. Randolph A.G., Vaughn F., Sullivan R., Rubinson L., Thompson B.T., Yoon G., et al. Critically ill children during the 2009–2010 influenza pandemic in the United States. *Pediatrics*. 2011; 128(6): e1450–8. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-0774>
 8. Giersing B.K., Dastgheyb S.S., Modjarrad K., Moorthy V. Status of vaccine research and development of vaccines for *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*. 2016; 34(26): 2962–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.110>
 9. Shapiro A., Raman S., Johnson M., Piehl M. Community-acquired MRSA infections in North Carolina children: prevalence, antibiotic sensitivities, and risk factors. *N. C. Med. J.* 2009; 70(2): 102–7.
 10. Dibah S., Arzanlou M., Jannati E., Shapouri R. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens in Ardabil, Iran. *Iran. J. Microbiol.* 2014; 6(3): 163–8.
 11. McCullers J.A., Rehg J.E. Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. *J. Infect. Dis.* 2002; 186(3): 341–50. <https://doi.org/10.1086/341462>
 12. Iverson A.R., Boyd K.L., McAuley J.L., Plano L.R., Hart M.E., McCullers J.A. Influenza virus primes mice for pneumonia from *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(6): 880–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq113>
 13. Mina M.J., Klugman K.P. The role of influenza in the severity and transmission of respiratory bacterial disease. *Lancet Respir. Med.* 2014; 2(9): 750–63. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70131-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70131-6)
 14. Huber V.C., Peltola V., Iverson A.R., McCullers J.A. Contribution of vaccine-induced immunity toward either the HA or the NA component of influenza viruses limits secondary bacterial complications. *J. Virol.* 2010; 84(8): 4105–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.02621-09>
 15. Chaussee M.S., Sandbulte H.R., Schuneman M.J., DePaula F.P., Addengast L.A., Schlenker E.H., et al. C. Inactivated and live, attenuated influenza vaccines protect mice against influenza: *Streptococcus pyogenes* super-infections. *Vaccine*. 2011; 29(21): 3773–81. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.031>
 16. Okamoto S., Kawabata S., Fujitaka H., Uehira T., Okuno Y., Hamada S. Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza *Streptococcus pyogenes* superinfection. *Vaccine*. 2004; 22(21-22): 2887–93. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.12.024>
 17. Tricco A.C., Chit A., Soobiah C., Hallett D., Meier G., Chen M.H., et al. Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 2013; 11: 153. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-153>
 18. Lang P.O., Mendes A., Socquet J., Assir N., Govind S., Aspinall R. Effectiveness of influenza vaccine in aging and older adults: comprehensive analysis of the evidence. *Clin. Interv. Aging*. 2012; 7: 55–64. <https://doi.org/10.2147/CIA.S25215>
 19. Govaert T.M., Thijs C.T., Masurel N., Sprenger M.J., Dinant G.J., Knottnerus J.A. The efficacy of influenza vaccination in elderly individuals. A randomized double-blind placebo-controlled trial. *JAMA*. 1994; 272(21): 1661–5.
 20. Carrat F., Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*. 2007; 25(39-40): 6852–62. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.027>
 21. Klausberger M., Leneva I.A., Egorov A., Strobl F., Ghorbanpour S.M., Falynskova I.N., et al. Off-target effects of an insect cell-expressed influenza HA-pseudotyped gag-VLP preparation in limiting postinfluenza *Staphylococcus aureus* infections. *Vaccine*. 2019; 38(4): 859–67. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.083>
 22. Klausberger M., Leneva I.A., Falynskova I.N., Vasiliev K., Poddubikov A.V., Lindner C., et al. The potential of influenza HA-specific immunity in mitigating lethality of postinfluenza pneumococcal infections. *Vaccines*. 2019; 7(4): 187. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040187>
 23. Leneva I.A., Burtseva E.I., Yatsyshina S.B., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Selkova E.P., et al. Virus susceptibility and clinical effectiveness of anti-influenza drugs during the 2010–2011 influenza season in Russia. 2016. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 43: 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.01.001>
 24. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Available at: <https://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf>
 25. McCullers J.A., Bartmess K.C. Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 2003; 187(6): 1000–9. <https://doi.org/10.1086/368163>
 26. Alymova I.V., Samarasinghe A., Vogel P., Green A.M., Weinelich R., McCullers J.A. A novel cytotoxic sequence contributes to influenza A viral protein PB1-F2 pathogenicity and predisposition to secondary bacterial infection. *J. Virol.* 2014; 88(1): 503–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.01373-13>
 27. Li N., Ren A., Wang X., Fan X., Zhao Y., Gao G.F., et al. Influenza viral neuraminidase primes bacterial coinfection through TGF- β -mediated expression of host cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112(1): 238–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414422112>
 28. Zurli V., Gallotta M., Taccone M., Chiarot E., Brazzoli M., Corrente F., et al. Positive contribution of adjuvanted influenza vaccines to the resolution of bacterial superinfections. *J. Infect. Dis.* 2016; 213(12): 1876. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw048>
 29. Zens K.D., Chen J.K., Farber D.L. Vaccine-generated lung tissue-resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection. *JCI Insight*. 2016; 1(10): e85832. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.85832>

Информация об авторах

Ленева Ирина Анатольевна[✉] — д.б.н., зав. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>. E-mail: wnyfd385@yandex.ru

Фалынскова Ирина Николаевна — н.с. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9836-9620>.

Карташова Надежда Павловна — н.с. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>.

Information about the authors

Irina A. Leneva[✉] — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental virology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>. E-mail: wnyfd385@yandex.ru

Irina N. Falynskova — researcher, Laboratory of experimental virology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9836-9620>.

Nadezhda P. Kartashova — researcher, Laboratory of experimental virology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>.

Глубокова Екатерина Андреевна — м.н.с. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5925-9733>.

Поддубиков Александр Владимирович — к.м.н., зав. лаб. микробиологии условно-патогенных бактерий, ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>.

Свитич Оксана Анатольевна — д.м.н., проф., член-корр. РАН, зав. лаб. молекулярной иммунологии, директор ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Ekaterina A. Glubokova — junior researcher, Laboratory of experimental virology, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5925-9733>.

Aleksandr V. Poddubikov — PhD (Med.), Head, Laboratory of microbiology of opportunistic bacteria, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>.

Oksana A. Svitich — D. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of RAS, Head, Laboratory of molecular immunology, Director, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.