

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЗАЩИТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА КАНДИДАТНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЖИВОЙ КОКЛЮШНОЙ ВАКЦИНЫ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Цель. Изучение защитной активности кандидатной рекомбинантной живой коклюшной вакцины (РЖКВ) интраназального применения. *Материалы и методы.* В работе использованы два метода оценки защитной активности коклюшных вакцин, основанные на определении выживаемости выкцинированных мышей: традиционный — после внутримозгового в тестах внутримозгового заражения бактериями *B. pertussis* 18323 и интраназального заражения вакцинированных мышей вирулентными бактериями рода *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. paraptussis* и *B. bronchiseptica*). *Результаты.* Предложен оригинальный метод, характеризующий защитную активность коклюшных вакцин, обусловленную мукозальной составляющей иммунитета. Защитная активность сконструированной авторами живой рекомбинантной коклюшной вакцины интраназального применения, определенная двумя методами, превосходила защитную активность коммерческого препарата АКДС. РЖКВ обеспечивала защиту от заражения мышей природными и рекомбинантными бактериями рода *Bordetella*. *Заключение.* Изученная рекомбинантная живая коклюшная вакцина интраназального применения имеет выраженный защитный потенциал и может быть рекомендована для проведения клинических исследований.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 60—69

Ключевые слова: живая вакцина, интраназальное применение, защитная активность, выживаемость

L.N.Sinyashina, E.G.Semin, A.Yu.Medkova, R.A.Syundyukova, G.I.Karataev

PRE-CLINICAL STUDY OF PROTECTIVE POTENCY OF CANDIDATE RECOMBINANT LIVE PERTUSSIS VACCINE FOR INTRANASAL ADMINISTRATION

Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

The aim of present research is studying of protective potency of candidate recombinant live pertussis vaccine (RLPV) for intranasal administration. *Materials and methods.* Two methods of protective potency assessment, based on mice survival estimating, were used: after intracerebral administration of *B. pertussis* 18323 bacteria and after intranasal administration of virulent *Bordetella spp.* bacteria (*B. pertussis*, *B. paraptussis* and *B. bronchiseptica*) to immunized mice. *Results.* An ingenious method of pertussis vaccine protective potency assessment due to mucosal immunity is suggested. Protective potency of constructed RLPV estimated in two tests of intracerebral and intranasal administration was higher than market image drug of DTP vaccine. RLPV provided protection from infection in mice after administration of both wild type and recombinant *Bordetella spp.* bacteria. *Conclusion.* Examined recombinant live pertussis vaccine (RLPV) for intranasal administration has significant protective potential and could be recommended for using in clinical trials.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 60—69

Key words: live pertussis vaccine, intranasal administration, protective potency, survival

ВВЕДЕНИЕ

Коклюш — тяжелое инфекционное заболевание, передающееся воздушно-капельным путем и относящееся к категории управляемых инфекций, контролируемых с помощью вакцинопрофилактики. С начала 1950-х годов вакцинацию против коклюша во всем мире проводят цельноклеточными коклюшными вакцинами (ЦКВ) в составе АКДС. В начале 1990-х годов в ряде экономически развитых стран ЦКВ заменили на менее реактогенные бесклеточные (ацелюлярные) коклюшные вакцины (БКВ) в составе АаКДС. Однако, несмотря на успехи вакцинопрофилактики коклюша, заболеваемость во всем мире неуклонно растет [9]. Все чаще выявляют коклюш у подростков и взрослых, растет число атипичных форм заболевания и, так называемого, бессимптомного носительства. Клинические изоляты возбудителя коклюша содержат измененные новые генотипы бактерий *B. pertussis*, позволяющие нивелировать поствакцинальный иммунитет [1,14]. Краткосрочность протективного иммунитета, индуцированного современными коклюшными вакцинами, также отражается на увеличении заболеваемости в атипичных формах и распространенности коклюша в разных возрастных группах. Сложившаяся эпидемиологическая картина диктуют необходимость совершенствования применяемых коклюшных вакцин, а также создания новых, позволяющих эффективно иммунизировать младенцев и ревакцинировать подростков и взрослых. В НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи разработана инновационная рекомбинантная живая коклюшная вакцина (РЖКВ) для интраназального применения. РЖКВ содержит генетически модифицированные бактерии *B. pertussis* 4MKS, несущие две мутации в опероне *ptx* и точечную мутацию в его промоторной области, а также нокаутную мутацию гена *dnt*. Бактерии *B. pertussis* 4MKS, также как и сконструированные ранее аттенуированные бактерии, продуцируют нетоксичную форму коклюшного токсина (КТ) и не синтезируют дермонекротический токсин (ДНТ) [4,5]. Рекомбинантные бактерии *B. pertussis* 4MKS в результате сайт-направленного мутагенеза промоторной зоны оперона *ptx* приобрели наиболее распространенный в настоящее время в популяции возбудителя коклюша генотип *ptxP3*, характеризующийся повышенной экспрессией КТ в сравнении с бактериями генотипа *ptxP1* [4,6]. Целью настоящей работы было изучение защитной активности кандидатной рекомбинантной живой коклюшной вакцины интраназального применения в тестах внутримозгового и интраназального заражения вакцинированных мышей вирулентными бактериями рода *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактерии *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* культивировали на твердой питательной среде КУА с добавлением 10% дефибринированной крови барана при температуре 35°-37°С в течение 24-36 ч. После интраназального заражения у эвтаназированных мышей извлекали легкие, гомогенизировали в 0,85% растворе хлорида натрия рН 7.2-7.4, инкубировали при температуре 35°С 15 мин и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5-10 мин. По 0,1 мл супернатанта высевали на три чашки Петри с селективной средой. Для выделения ДНК супернатанты гомогенатов легких обрабатывали раствором гуанидинтиоцианата с последующей сорбцией ДНК на магнитном сорбенте фирмы «Promega» США [2]. Использована разработанная нами тест-система для ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) [2]. Защитную активность РЖКВ и субстанции — аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS определяли после однократного интраназального введения трех пятикратных разведений

препарата, начиная с дозы 0,750 МЕ в 0,025 мл 20 мышам. Коммерческий препарат АКДС разводили в соответствии с инструкцией до концентрации 0,750 МЕ в 0,5 мл и вводили внутрибрюшинно однократно 20 мышам. Спустя 17-20 суток после иммунизации мышей заражали интрацеребрально вирулентными бактериями *V.pertussis* 18323. В экспериментах использовали мышей линии Balb/c1 обоего пола весом 10-12 г. Одновременно из этой же партии использовали мышей для титрования ЛД₅₀ штамма *V. pertussis* 18323. Тест считали положительным, если препарат обеспечивал выживаемость более 70 % мышей при заражении их не менее 100 ЛД₅₀ [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Существующие в настоящее время для профилактики коклюша вакцины АКДС и АаКДС применяют парентерально (внутримышечно), и методы изучения их защитной активности предполагают подкожное или внутрибрюшинное однократное введение тестируемых препаратов мышам. Для доклинического исследования живых коклюшных вакцин нами отработан метод интраназального введения бактерий *V. pertussis* лабораторным животным. Для иммунизации и экспериментального заражения суспензию бактерий *V. pertussis* вводили интраназально, используя краткосрочный наркоз, обеспечивающий свободное дыхание животного. Обездвиживание мышей достигалось внутримышечным введением раствора золетила (Франция) в количестве 0,2-0,4 мг. После наркоза каплю суспензии на конце иглы шприца Гамильтон (20-25 мкл) подносили к носу мыши, добиваясь ее полного вдыхания без разбрызгивания. Для определения эффективной дозы было определено количество бактерий *V. pertussis* в респираторном тракте мыши через час после интраназального введения препарата. С этой целью гомогенат легких мышей в разведениях высевали на среду КУА с кровью и параллельно определяли количество геном—эквивалентов *V. pertussis* с помощью ПЦР РВ. Установлено, что через один час после интраназальной инокуляции около 10⁹ бактерий *V. pertussis* методом ПЦР РВ в легких мышей регистрируется около 10⁶ ГЭ *V. pertussis*, а бактериологическим методом 10⁵ КОЕ.

Интраназальное введение РЖКВ проводили по описанной выше методике. Результаты экспериментов представлены на рис. Установлено, что мыши, интраназально иммунизированные РЖКВ в дозе 0,75х10⁹ м.к. (0,75 МЕ), выживали в 100% случаев при заражающей дозе в 300 ЛД₅₀. В среднем 89,7 % выживаемости мышей обеспечивала доза вакцины 0,15 МЕ и 59% — 0,03 МЕ. Таким образом, предполагаемая защитная доза РЖКВ, обеспечивающая выживание более 70% вакцинированных мышей, близка к 0,15 МЕ. В качестве сравнения были выбраны: коммерческий препарат АКДС С1252/ААП/15 НПО «Микроген» и изогенные аттенуированные бактерии *V. pertussis* 4М генотипа рtxP1. АКДС защищала только 85% мышей даже при иммунизации максимальной дозой. Выживаемость при дозе 0,15 МЕ составляла 60%, а при минимальной дозе выживало 10 % мышей, интрацеребрально зараженных вирулентными бактериями *V. pertussis* 18323. Интраназальная иммунизация живыми бактериями *V. pertussis* 4М обеспечивала 60% выживаемости мышей при дозе равной 0,15 МЕ, в то время как тот же уровень защиты обеспечивали бактерии *V. pertussis* 4МКС (РЖКВ) в дозе в 5 раз меньшей — 0,03 МЕ.

Ранее нами были сконструированы рекомбинантные бактерии *V. bronchiseptica* 8220-17, продуцирующие коклюшный токсин (КТ) [6]. КТ, продуцируемый рекомбинантными бактериями *V.bronchiseptica* 8220-17, обладает свойствами нативного КТ, экспрессируемого вирулентными бактериями *V.pertussis*. Следует отметить, что помимо описанных ранее иммунобиологических характеристик, интраназальное введение бактерий *V.bronchiseptica* 8220-17 макакам резус сопровождалось развити-

ем лейкоцитоза и выработкой специфических антител к КТ, взаимодействующих с нативным КТ (не опубликовано).

Бактерии *V.pertussis* 475 выращивали на среде КУА с кровью в течение 24—30 часов, *V.parapertussis* 504 — 18-20 ч, *V.bronchiseptica* 8220-17 — 12-16 ч. Культуру собирали с чашек, суспендировали в 0,85% растворе хлорида натрия до концентрации 120 МЕ ($1,2 \times 10^{11}$ м.к. в мл) и по 25 мкл суспензии в соответствующих разведениях вводили мышам. Для инокуляции использовали исходную культуру и два 3-кратные разведения, содержащие 3×10^9 , 1×10^9 и 3×10^8 МЕ, соответственно. Контролем служили мыши, которым интраназально вводили по 25 мкл 0,85% раствора хлорида натрия. Определение количества бактерий в легких животных через час после введения показало, что при интраназальном введении 3×10^9 м.к. регистрировали от 10^6 до 10^7 ГЭ бактерий, при введении дозы 3×10^8 — высевали порядка 10^5 КОЕ. Рассчитанное из количества инокулированных бактерий рода *Bordetella* значение ЛД₅₀ составляло (0,25-0,47) $\times 10^9$ м.к. Результаты представлены в табл. 1. Наибольшую гибель мышей наблюдали в период с 3 по 17 дни, при введении 3×10^9 м.к. погибало 100% мышей и 80-100% при дозе 10^9 м.к. Доза $0,3 \times 10^9$ м.к. вызывала гибель 60-80% мышей. Инфицированные мыши теряли в весе, изменялся шерстяной покров (выпадение, взъерошенность и т.п.), снижалась двигательная активность (сбивались в кучу, сидели без движения). Через 20 дней состояние выживших мышей приходило в норму. В контрольной группе все мыши оставались живыми. Срок наблюдения 30 суток.

Интраназальную иммунизацию мышей проводили тремя сериями РЖКВ. ЛД₅₀ вирулентных бактерий *V. bronchiseptica* 8220 и 8220-17 (рекомбинантный штамм продуцирующий нативный КТ), *V. pertussis* 475, *V. parapertussis* 504 определены в соответствии с результатами, представленными в табл. 1. Иммунизированных РЖКВ мышей заражали интраназально разрешающей дозой $(3-5) \times 10^9$ м.к., что соответствовало 7-12 ЛД₅₀ для использованных вирулентных бактерий рода *Bordetella*. Результаты эксперимента приведены в табл. 2.

В настоящем сообщении представлены результаты изучения защитной активности РЖКВ интраназального применения.

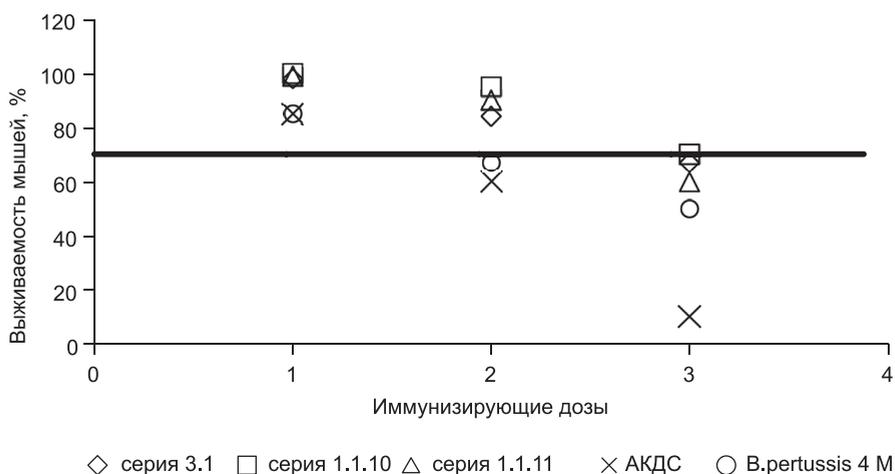
Таблица 1. Определение вирулентности бактерий *V.pertussis* 475, *V.parapertussis* 504 и *V.bronchiseptica* 8220-17

Бактерии	Заражающая доза ($\times 10^9$ м.к.)	Нв/No	ЛД ₅₀ ($\times 10^9$ м.к.)
<i>V. bronchiseptica</i> 8220-17	3,0	0/10	0,25
	1,0	1/10	
	0,3	2/10	
<i>V. pertussis</i> 475	3,0	0/10	0,29
	1,0	0/10	
	0,3	4/10	
<i>V. parapertussis</i> 504	3,0	0/10	0,44
	1,0	2/10	
	0,3	4/10	
<i>V. bronchiseptica</i> 8220	3,0	0/10	0,47
	1,0	1/10	
	0,3	3/10	

Примечание. Нв — количество выживших мышей; No — количество мышей в эксперименте (здесь и в табл. 2).

Таблица 2. Защитная активность РЖКВ в тесте интраназального заражения мышей живыми бактериями *V.pertussis* 475, *V.bronchiseptica* 8220-17 и *V.parapertussis* 504

Препарат	Доза ($\times 10^9$ м.к.)	Нв/No и % выживших мышей		
		В.п. 475	В.б. 8220-17	В.рр. 504
РЖКВ, серия 3.1	0,75	10/10	9/10	10/10
	0,15	10/10	9/10	10/10
	0,03	8/10	7/10	7/10
РЖКВ, серия 1.1.10	0,75	10/10	10/10	10/10
	0,15	9/10	8/10	9/10
	0,03	8/10	8/10	7/10
РЖКВ, серия 1.1.11	0,75	9/10	10/10	10/10
	0,15	10/10	10/10	8/10
	0,03	8/10	8/10	9/10
Вакцина АКДС	0,75	9/10	7/10	10/10
	0,15	7/10	6/10	8/10
	0,03	4/10	3/10	4/10



Защитная активность РЖКВ после внутримозгового заражения мышей вирулентными бактериями *V. pertussis* 18323.

РЖКВ — серии 3.1, 1.1.10, 1.1.11; АКДС — серия С1252/ААП/15; *V. pertussis* 4М — аттенуированные бактерии *V. pertussis* генотипа Ptx P1; горизонтальная линия: контрольный уровень 70% выживания мышей; иммунизирующие дозы: 1 — $0,75 \times 10^9$ м.к.; 2 — $0,15 \times 10^9$ м.к.; 3 — $0,03 \times 10^9$ м.к.

Для оценки защитной активности ЦКВ, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, как правило, используют тест внутримозгового (интрацеребрального) заражения иммунизированных мышей вирулентными бактериями тестового штамма *V. pertussis* 18323 [3,17]. Защитную активность новых препаратов БКВ в Европе и США определяют по иммуногенности — способности индуцировать выработку специфических противокклюшных антител, в сравнении с лицензированными препаратами. В Японии, Китае, Корее для оценки БКВ используют разные модификации теста интрацеребрального заражения (ICN или MICA). Применяется также методика сравнительной оценки скорости выведения вирулентных бактерий *V. pertussis* из легких мышей после интраназального заражения контрольных и вакцинированных животных (INCA) [17]. Именно такой метод использован для оценки протективности живых аттенуированных бактерий *V. pertussis* BPZE1, сконструированных французскими учеными [13]. Основные трудности при определении защитной активности новых вакцинных препаратов состоят в сложности стандартизации предлагаемых методов и сопоставлении полученных результатов [17]. Нам представляется, что метод определения защитной активности коклюшных вакцин в тесте интрацеребрального заражения мышей, несмотря на его трудоемкость, достаточно воспроизводим, хорошо коррелирует с защитной активностью ЦКВ и пригоден для оценки протективности рекомбинантных живых коклюшных вакцин. Для того, чтобы оценить протективность живой вакцины при естественном для коклюша интраназальном введении вирулентных бактерий, нами разработан метод, предполагающий определение выживаемости контрольных и интраназально вакцинированных мышей после их интраназального заражения вирулентными бактериями рода *Bordetella* [6]. Описание подобного метода в современной литературе не встречается.

Проведенные исследования показали, что внутримышечное введение золетила в дозе 0,2-0,4 мг приводит к краткосрочному (5-10 мин) обездвиживанию мышей (крысят) и сохраняет равномерное дыхание животных. В таком состоянии они способны вдохнуть 20-25 мкл суспензии (10^8 - 10^9 МОЕ) в виде капли на конце иглы

шприца «Гамильтон» без разбрызгивания и потери материала. Эвтаназия животных через час после введения препарата показала, что в легких регистрируется около (10^5 - 10^6) ГЭ, что значительно меньше количества инокулированных бактерий. Результат одинаков для вирулентных и аттенуированных бактерий *V. pertussis*, рекомбинантных бактерий *V. bronchiseptica* 8220-17 и природных изолятов *V. bronchiseptica* 8220 и *V. paraptussis* 504. Этот показатель важен для определения дозы препарата РЖКВ, формирующей определенный защитный эффект, и его следует учитывать при оценке результатов как в экспериментах с животными, так и при планировании вакцинирующей дозы в клинических исследованиях РЖКВ. Защитную активность РЖКВ при вакцинации мышей интраназальным способом проверяли в двух тестах. Интрацеребральное заражения мышей вирулентными бактериями *V. pertussis* 18323 продемонстрировало высокую протективность препарата РЖКВ, превосходящую защитную активность коммерческого препарата АКДС серии С1252/ААП/15 НПО «Микроген». Препарат РЖКВ, согласно критериям, применяемым для ЦКВ, может быть использован для иммунизации мышей в дозе 0,15 КОЕ. Полученный нами результат является тем более убедительным после оценки количества коклюшных микробных клеток, выявленных в легких мышей через час после иммунизации РЖКВ. По-видимому, реальная доза живых рекомбинантных бактерий *V. pertussis* 4МКС, формирующая иммунный ответ при интраназальном введении, в сотни (100-1000) раз меньше, чем инактивированных вирулентных бактерий *V. pertussis* в составе АКДС вакцины, вводимой парентерально. Аналогичные результаты описаны нами ранее для генетически аттенуированных бактерий, сконструированных на основе других реципиентов *V. pertussis* [5].

Результаты сравнительного определения защитной активности аттенуированных бактерий *V. pertussis* 4МКС в составе РЖКВ, содержащих новый генотип ptxP3, и изогенных бактерий *V. pertussis* 4М генотипа ptxP1 выявили тенденцию увеличения защитной активности у бактерий *V. pertussis* 4МКС. Действительно, на фоне некоторого общего снижения выживаемости с уменьшением количества МЕ в иммунизирующей дозе выживаемость мышей в пределах 60% обеспечивается дозой, равной 0,15 МЕ для штамма *V. pertussis* 4М (ptx P1) и 0,03 МЕ — *V. pertussis* 4МКС (ptx P3). Этот результат, скорее всего, указывает на то, что пороговая 70% выживаемость мышей после интрацеребрального заражения обеспечивается достоверно меньшей иммунизирующей дозой аттенуированных бактерий *V. pertussis* 4МКС. Следует понимать, однако, что защитная активность аттенуированных бактерий *V. pertussis* является интегральной характеристикой и 2—3-кратное увеличение уровня продукции одного, пусть даже и самого важного, протективного антигена КТ*, может быть недостаточным для значительного усиления защитной активности, измеряемой в мышинной модели. Более полное заключение о потенциале защитной активности рекомбинантных аттенуированных бактерий *V. pertussis* 4МКС в сравнении с изогенными бактериями *V. pertussis* 4М довакцинного генотипа ptx P можно сделать после сравнительного анализа защитной активности нескольких экспериментальных серий РЖКВ и *V. pertussis* 4М, определенных в тестах интрацеребрального и интраназального заражения. Таким образом, препарат РЖКВ интраназального применения обладал защитной активностью, превосходящую таковую у вакцины АКДС в тесте интрацеребрального заражения иммунизированных мышей вирулентными бактериями *V. pertussis* 18323.

Особый интерес представляет определение защитной активности РЖКВ интраназального применения по выживаемости мышей зараженных интраназально вирулентными бактериями. Такой тест в максимальной степени приближен к е-

тественному заражению людей при коклюшной инфекции, но в литературе не описан. Описанные в литературе результаты определения вирулентности бактерий рода *Bordetella* при экспериментальном интраназальном заражении мышей немногочисленны, не содержат описания процедуры инокуляции бактерий, и с нашей точки зрения не могут быть экстраполированы на условия наших экспериментов. Анализ литературы показывает, что разные штаммы бактерий рода *Bordetella* имеют большой разброс значений ЛД₅₀ при интраназальном заражении мышей [7, 8], что связано, вероятно, как со свойствами самих бактерий, так и с используемыми линиями мышей, зависит от способа заражения и учета количества бактерий *Bordetella* в инфицирующей дозе. Так, например, для бактерий *B. bronchiseptica* RB50 ЛД₅₀ составляет около 10⁷, а для *B. bronchiseptica* 253 — около 10⁶ на мышах линии C57BL/6 [7,8]. Поэтому изучению защитной активности РЖКВ в тесте экспериментальной интраназальной инфекции мышей вирулентными бактериями *B. pertussis* 475, *B. bronchiseptica* 8220-17, *B. bronchiseptica* 8220 в наших экспериментах предшествовало определение их вирулентности (ЛД₅₀) на нативных лабораторных мышах Balb/C1. Приведенные в работе результаты показывают, что использованные нами штаммы имели высокую степень вирулентности, вызывающую гибель интраназально инфицированных мышей в дозах равных или меньше 10⁶ м.к., регистрируемых в легких через час после заражения. Также как и в экспериментах с аттенуированными бактериями *B. pertussis*, наблюдали разницу в количестве интраназально инокулированных и зарегистрированных в легких мышей бактерий сразу после инфицирования.

Интраназальное заражение лабораторных мышей бактериями *B. pertussis* 475, *B. bronchiseptica* 8220-17, *B. bronchiseptica* 8220 и *B. parapertussis* 504 приводило к развитию легочной инфекции и гибели животных в первые 17 дней. У выживших особей наблюдали значительную потерю массы тела, изменение шерстяного покрова и нарушение двигательной активности. Необходимо отметить, что использованные для анализа природные и рекомбинантные бактерии рода *Bordetella* отличались продукцией коклюшного токсина. Бактерии *B. pertussis* 475, *B. bronchiseptica* 8220-17 продуцировали нативный КТ, а у *B. bronchiseptica* 8220 и *B. parapertussis* 504 синтез КТ отсутствовал. Тем не менее, мыши, инфицированные всеми использованными штаммами, погибали примерно в одни и те же сроки с характерными клиническими проявлениями заболевания. Общей для всех изученных штаммов *Bordetella* была способность продуцировать аденилатциклазный токсин, дермонекротический токсин, гемагглютинин, пертактин и другие факторы вирулентности. В настоящее время роль каждого из перечисленных факторов вирулентности в патогенезе коклюша изучена недостаточно. Наиболее вероятно, гибель мышей в первые дни после инфекции была обусловлена действием ДНТ. В пользу такого предположения говорят результаты определения остаточной вирулентности, специфической и общей токсичности аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS [6]. Они не проявляли токсических свойств даже при интраназальном введении 10¹⁰ МЕ суспензии мышатам, крысам и взрослым мышам и отличались от вирулентных бактерий *B. pertussis* 475, *B. bronchiseptica* 8220-17, *B. parapertussis* 504 и *B. bronchiseptica* 8220 — отсутствием продукции ДНТ и активного КТ. Таким образом, по-видимому, гибель мышей, инфицированных перечисленными штаммами бактериями рода *Bordetella*, по крайней мере, отчасти обусловлена действием ДНТ на легкие животных.

Основываясь на значениях ЛД₅₀ бактерий *B. pertussis* 475, *B. bronchiseptica* 8220-17, *B. bronchiseptica* 8220 и *B. parapertussis* 504, нами определены заражающие летальные дозы, составляющие (7-12) ЛД₅₀ для определения защитной активности

РЖКВ. Такие исследования представляют интерес как для определения защитного потенциала коклюшных вакцин против близкородственных микроорганизмов, так и для выбора оптимального штамма для тестирования эффективности препаратов. Полученные нами результаты показали, что интраназальная иммунизация РЖКВ защищает мышей от интраназальной инфекции вирулентными бактериями возбудителя бронхосептикоза у животных (*B. bronchiseptica*), паракоклюша (*B. parapertussis*) и коклюша (*B. pertussis*). Показана защитная активность РЖКВ после экспериментальной инфекции мышей вирулентными бактериями *B. pertussis* 475. Этот результат совпадает с выводами аналогичных исследований [10 — 12] и вполне ожидаем, поскольку бактерии рода *Bordetella* близки друг к другу по структуре и последовательности геномов, продукции большого числа общих факторов вирулентности. Они имеют одинаковую регуляцию экспрессии основных генов вирулентности, а бактерии *B. pertussis* и *B. parapertussis* эволюционировали из разных клонов *B. bronchiseptica* [15]. Менее предсказуема выявленная нами защитная активность коммерческого препарата АКДС от интраназального заражения мышей бактериями *B. pertussis*. Этот результат совпадает с результатами тестирования бактериальной нагрузки в носоглотке вакцинированных ЦКВ павианов анубис после их экспериментального заражения вирулентными бактериями возбудителя коклюша. В работе [16] продемонстрирована ускоренная по отношению к невакцинированным животным элиминация бактерий у обезьян, инъекционно вакцинированных ЦКВ.

Зависимость защитной активности от вакцинирующей дозы в наших экспериментах качественно не отличаются при использовании внутримозговом заражении мышей бактериями *B. pertussis* 18323 и их интраназального заражения вирулентными бактериями рода *Bordetella*. Однако были выявлены некоторые количественные отличия. В тесте интраназального заражения бактериями *B. pertussis* 475, *B. parapertussis* 504 и *B. bronchiseptica* 8220-17 защита животных не менее 70% обеспечивалась при иммунизации дозой аттенуированных бактерий *B. pertussis* равной 3×10^7 МЕ в 5 раз меньшей, чем в тесте внутримозгового заражения мышей *B. pertussis* 18323. Процент выживаемости мышей, иммунизированных коммерческим препаратом АКДС вакцины, был выше по сравнению с внутримозговым заражением *B. pertussis* 18323, но более низкий, чем у РЖКВ в обоих этих тестах. Эти результаты согласуются с предположением о способности ЦКВ при парентеральном введении индуцировать некоторый мукозальный иммунный ответ, продемонстрированный недавно в экспериментах с приматами [16].

Так как ДНТ, с одной стороны, согласно существующим представлениям, не является протективным антигеном, а с другой стороны, не синтезируется аттенуированными бактериями *B. pertussis*, справедливо предположить, что высокий уровень защиты мышей после интраназальной иммунизации обеспечивается мукозальной, а не антитоксической составляющей противокклюшного иммунного ответа, защищающего на стадии адгезии и инвазии. Этот вывод согласуется с результатами сравнительного измерения защитной активности в тестах внутримозгового заражения *B. pertussis* 18323 и интраназального заражения. Защита мышей не менее 70% от интраназального инфицирования обеспечивалась иммунизирующей дозой аттенуированных бактерий *B. pertussis* в 5 раз меньшей, чем при использовании теста внутримозгового заражения. Таким образом, предлагаемая нами модель интраназального заражения для оценки защитной активности РЖКВ позволяет определять противобактерийную мукозальную составляющую поствакцинального противокклюшного иммунитета. Более детальное изучение корреляции результатов интраназального и внутримозгового заражения мышей, иммунизированных разными коклюшными

вакцинами, позволит определить применимость предложенной экспериментальной модели. В наших экспериментах не было выявлено существенной разницы в результатах тестирования РЖКВ, полученных при использовании бактерий *B. pertussis* 475, *B. parapertussis* 504 и *B. bronchiseptica* 8220-17. Если этот результат подтвердится в последующих экспериментах, предлагаемый тест и сконструированные нами рекомбинантные бактерии *B. bronchiseptica* 8220-17 могут быть хорошей альтернативой используемому в настоящее время трудоемкому, требующему достаточно высокой квалификации методу внутримозгового заражения мышей прихотливыми, медленно растущими, требующими стандартных сред с добавлением крови бактериями *B. pertussis* 18323. Представленные результаты показали, что препарат РЖКВ интраназального применения защищал мышей от инфицирования вирулентными бактериями других патогенных для человека видов рода *Bordetella*. Наши результаты согласуются с данными доклинического изучения аттенуированных бактерий *B. pertussis* BPZE1, сконструированных французскими исследователями [11,13] и позволяют констатировать, что разработанная кандидатная рекомбинантная живая коклюшная вакцина будет защищать не только от коклюша, но и паракоклюша и бронхосептикоза.

Исследования последнего десятилетия в разных странах, в том числе и в России, показали, что в настоящее время на фоне массовой вакцинации против коклюша штаммы циркулирующих бактерий *B. pertussis* содержат измененные последовательности генов вирулентности — *ptx*, *fga*, *prn*, отличающиеся от таковых в довакцинальном периоде. Высказываются предположения, что одна из причин роста заболеваемости коклюшем связана с циркуляцией возбудителя с новыми генотипами [1, 6, 14]. Для совершенствования современных коклюшных вакцин рассматривается возможность замены вакцинных штаммов довакцинного генотипа на новые, относящиеся к современным генотипам. Рекомбинантные бактерии *B. pertussis* 4MKS с новым генотипом *ptxP3*, сконструированные на основе изогенных аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4M довакцинного генотипа *ptxP1*, сохраняют стабильность генома и заданные биологические характеристики, продуцируют большее количество токсоида [4,6]. Представленные в настоящем сообщении результаты позволяют констатировать, что регуляторная мутация в опероне *ptxP1*, увеличивающая экспрессию оперона *ptx*, привела к усилению защитной активности аттенуированных бактерий *B. pertussis*. Разработанная нами генетическая методология может быть использована для необходимой модификации бактерий *B. pertussis* довакцинных генотипов с целью создания вакцинных препаратов на основе регламентированных производственных штаммов. Использование предполагаемого подхода позволит своевременно реагировать на необходимость замены генотипов в вакцинных штаммах, согласно с превалированием новых генотипов в популяции *B. pertussis*, сэкономить время и средства на разработку эффективных препаратов для профилактики коклюша.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова О.Ю., Пименова А.С., Попова О.П. и др. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 4:22-27.
2. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Синяшина Л.Н. и др. Выявление инсерционных авирулентных *Bvg*- мутантов *Bordetella pertussis* у больных коклюшем, острой респираторной вирусной инфекцией и у практически здоровых людей. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2010, 4:9-13.
3. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунологические лекарственные препараты) под ред. А. Н. Миронова. М., 2012.

4. Семин Е. Г., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю. и др. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа рtхР3. Журн. микробиол. 2018, 4:33-42
5. Синяшина Л.Н., Синяшина Л.С., Семин Е.Г. и др. Конструирование генетически аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis*, утративших активность дермонекротического токсина и продуцирующих измененную нетоксичную форму коклюшного токсина. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2010, 3:31-36.
6. Синяшина Л.Н. Молекулярно-генетическая модификация бактерий рода *Bordetella* для создания рекомбинантных препаратов для профилактики коклюша. Дисс. докт. мед. наук, М., 2017.
7. Ahuja U., Liu M., Tomida S. et al. Phenotypic and Genomic Analysis of Hyper virulent Human-associated *Bordetella bronchiseptica*. BMC Microbiol. 2012, 6 (12):167 doi: 10.1186/1471-2180-12-167.
8. Buboltz A.M., Nicholson T.L., Parette M.L. et al. Replacement of Adenylate Cyclase Toxin in a Lineage of *Bordetella bronchiseptica*. J. Bacteriol. 2008, 190(15):5502-5511.
9. Carbonetti N.H., Wirsing von Kunig C. H., Lan R. et al. Highlights of the 11th International *Bordetella* Symposium: from Basic Biology to Vaccine Development. Clinical and Vaccine Immunology. 2016, 23(11) :842-850.
10. Feunou P.F., Bertout J., Lochet C. T- and B-cell-mediated protection induced by novel, live attenuated pertussis vaccine in mice. Cross protection against parapertussis. PLoS One. 2010, 15; 5(4):e10178. doi: 10.1371/journal.pone. 0010178.
11. Kammoun H., Feunou P.F., Foligne B. et al. Dual mechanism of protection by live attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 against *Bordetella bronchiseptica* in mice. Vaccine. 2012, 31; 30(40): 5864-5870. doi: 10.1016/j.
12. Liko J., Robison S.G., Cieslak P.R. Do Pertussis Vaccines Protect Against *Bordetella parapertussis*? Clin Infect Dis. 2017, 64(12):1795-1797. doi: 10.1093/cid/cix221.
13. Mielcarek N., Debrie A.S., Raze D. et al. Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. PLoS Pathog. 2006, 2(7) :0662-0670.
14. Mooi F.R. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. Infect. Genet. Evol. 2010, 10 (1) :36-49.
15. Park J., Zhang Y., Buboltz A. M. et al. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. BMC Genomics. 2012, 13:545.
16. Warfel J. M., Zimmerman L.I., Merkel Tod J. Comparison of Three Whole-Cell Pertussis Vaccines in the Baboon Model of Pertussis. Clin. Vaccine Immunol. 2015, 11;23(1):47-54. doi: 10.1128/CVI.00449-15.
17. World Health Organization 2011. Expert committee on biological standardization Geneva, 17-21 October 2011.

Поступила 14.11.18

Контактная информация: Синяшина Л.Н.,
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (495)193-30-01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.В.Сорокина^{1,2}, Н.К.Ахматова¹, Н.Б.Егорова¹

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ФИГУРНЫХ И ПАРАИНФЕКЦИОННЫХ ЭРИТЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И MNRI

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Академия постдипломного образования ФНЦ ФМБА России, Москва

Цель. Углубленное изучение этиопатогенеза эритем, сравнительное изучение клинической эффективности применения комбинированной терапии с применением иммуномодуляторов при эритемах, изучение динамики иммунологических показателей в результате терапии. *Материалы*