

И.А.Ленева¹, А.Ю.Егоров^{1,2}, И.Н.Фальинскова¹, Н.Р.Махмудова¹, Н.П.Карташова¹, Е.А.Глубокова¹,
Н.О.Вартанова¹, А.В.Поддубиков¹

ИНДУКЦИЯ ВТОРИЧНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ У МЫШЕЙ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ПАНДЕМИЧЕСКИМ И ЛАБОРАТОРНЫМ ШТАММАМИ ВИРУСА ГРИППА H1N1

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; ²НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева, Санкт-Петербург

Цель. Разработка и характеристика экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии, вызываемой *S. pneumoniae* и различными штаммами *S. aureus* после гриппозной инфекции, индуцированной пандемическим и лабораторным штаммами под-типа H1N1, а также их реассортантом. *Материалы и методы.* Мышей линии BALB/c инфицировали вирусами гриппа пандемическим и адаптированным к мышам А/Калифорния/04/2009, А/Пуэрто Рико /8/34 и их реассортантом NIBRG-121xp с последующим заражением различными штаммами. Патогенез инфекций оценивали по выживаемости и снижению массы животных, титру вируса и плотности бактерий в легких. *Результаты.* Показано, что заражение мышей тремя штаммами вируса гриппа H1N1 с сопоставимым уровнем патогенности приводит к различной степени тяжести вторичной бактериальной инфекции. При этом наибольшей способностью к нарушению антибактериального иммунитета обладал адаптированный к мышам пандемический вирус А/Калифорния/04/2009. *Заключение.* Разработана экспериментальная модель постгриппозной бактериальной пневмонии, индуцированной тремя штаммами вируса гриппа H1N1 и различными штаммами *S. aureus* или *S. pneumoniae*. Охарактеризована способность вирусов провоцировать бактериальную суперинфекцию различной степени тяжести.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 68—74

Ключевые слова: грипп; вирус гриппа; вторичные пневмонии после гриппозной инфекции, *S. aureus*, *S. pneumoniae*

I.A.Leneva¹, A.Yu.Egorov^{1,2}, I.N.Falynskova¹, N.R.Makhmudova¹, N.P.Kartashova¹, E.A.Glubokova¹,
N.O.Vartanova¹, A.V.Poddubikov¹

INDUCTION OF SECONDARY BACTERIAL PNEUMONIA IN MICE INFECTED WITH PANDEMIC AND LABORATORY STRAINS OF THE H1N1 INFLUENZA VIRUS

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; ²Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia

Aim. In this study we developed and characterized a mouse model of secondary *S. aureus* and *S. pneumoniae* pneumonia following influenza virus infection with H1N1 pandemic and laboratory strains and their reassortment. *Materials and methods.* BALB/c mice were infected intranasally with A/California/04/2009/(H1N1 pdm), A/Puerto Rico/8/34 or their reassortment NIBRG-121xp followed by different strains of *S. aureus* or *S. pneumoniae*. The pathogenicity of infection was assessed by mouse survival and weight change, viral titre and bacterial count in the lungs. *Results.* It was shown that the infection of mice with three strains of the H1N1 influenza virus with a comparable level of pathogenicity leads to a different severity of secondary bacterial infection. The mouse adapted A/California/04/2009 pandemic strain possessed the greatest ability to alter antibacterial immunity. *Conclusion.* An experimental model of post-influenza bacterial pneumonia utilizing three strains of the H1N1 influenza virus and various strains of *S. aureus* or *S. pneumoniae* was established. The ability of viruses to provoke bacterial superinfection of different severity is characterized.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 68—74

Key words: influenza, influenza virus, secondary bacterial pneumonia after influenza, *S. aureus*, *S. pneumoniae*

ВВЕДЕНИЕ

Большая часть смертельных исходов от гриппа обусловлена вторичными бактериальными осложнениями, среди которых ведущую роль занимают пневмонии. Показано, что распространенность пневмоний значительно увеличивается после эпидемий гриппа, достоверное увеличение смертности в результате пневмоний фиксировалось во время пандемий 1918, 1957, 1968 и 2009 гг. [3,8,12,14]. Во время последней пандемии, вызванной вирусом гриппа А Н1N1 в 2009 г., 25-56% тяжелых форм заболеваний и смертельных исходов были ассоциированы со вторичной пневмонией, из них 14-46% привели к смертельным исходам [3,8]. Вторичная инфекция *S. pneumoniae* наиболее часто коррелировала с тяжестью заболевания [13]. В то же время, в исследовании 838 критически больных детей в США показано, что в течение 72 ч после госпитализации в отделение интенсивной терапии у 33% детей развивалась бактериальная суперинфекция, причем в 26% случаев в качестве этиологического агента были выявлены *Staphylococcus aureus*, из которых 48% относились к метициллинрезистентным штаммам (MRSA) [13].

Несмотря на широкое внедрение сезонных гриппозных вакцин, противовирусных препаратов и антибиотиков, проблема бактериальных осложнений при гриппе не перестала быть актуальной, более того, развитие резистентности бактериальной флоры к современным антибиотикам может обострить данную проблему при возникновении новой пандемии гриппа. В настоящее время ВОЗ ставит задачу снижения пневмоний после гриппозной инфекции как одну из первоочередных, что отражено в целом ряде документов, включая «Программу исследований ВОЗ по гриппу с позиции общественного здравоохранения» [8,15], в которых подчеркивается важность проведения клинических и научных исследований, направленных на выявление прогностических маркеров тяжести пневмоний после гриппозной инфекции как приоритетного направления, которое заслуживает немедленного внимания. Моделирование у мышей пневмонии инфицированием их вирусом гриппа А с последующим заражением *S. pneumoniae* и *S. aureus* проведено в нескольких ведущих лабораториях мира и опубликовано в статьях [5,7, 9, 11]. Ранее нами также была разработана и охарактеризована мышьяная модель вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм Н1N1 2009) и *S. aureus*, в которой был выявлен летальный синергизм между патогенами, отмечаемый в эпидемиологических наблюдениях [2]. Вирус гриппа вносит ведущий вклад в возникновение летального синергизма при сочетанном заражении двумя патогенами. В связи с этим, выявление корреляции между патогенезом инфекции и биологическими свойствами вирусов гриппа является важнейшим подходом для определения взаимодействия между вирусным и бактериальным агентами в патогенезе вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции. Кроме того, использование вирусов различного происхождения может служить инструментом для выявления роли отдельных вирусных белков в патогенезе синергизма для определения его механизма с целью дальнейшей идентификации мишени для интервенции данной болезни.

Цель настоящей работы — разработка и характеристика экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии, вызываемой *S. pneumoniae* и различными штаммами *S. aureus* после гриппозной инфекции, индуцированной пандемическим и лабораторным штаммами подтипа Н1N1, а также их реассортантом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали клетки MDCK, полученные из коллекции НИИ вирусологии. Для моделирования гриппозной инфекции были использованы штамм вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм Н1N1 2009), полученный из ВОЗ, а также лабораторный штамм вируса гриппа А/Пуэрто Рико /8/34(Н1N1) и реассортант NIBRG-121xp (А/Калифорния/04/2009 (пндм Н1N1 2009)ХА/Пуэрто Рико /8/34(Н1N1) (2:6), полученные из музея НИИ гриппа. Вирус А/Калифорния/04/2009 (пндм Н1N1) адаптировали к мышам путем 5 последовательных пассажей через легкие. Для инфицирования животных вирусы выращивали в аллантаоисной полости 9-дневных куриных эмбрионов. Культуры штаммов *S. pneumoniae* №3405, вакцин-

ный штамм *S.aureus* №1986, *S.aureus* №329, *S.aureus* №884 получены из коллекции НИИВС им. И.И.Мечникова в лиофилизированном состоянии. Для восстановления жизнеспособности культуры в ампулу добавляли 0,5 мл питательного бульона ГРМ-бульон для *S.aureus* и сердечно-мозговой бульон (Mast Group Ltd, Великобритания). Суспензию переносили в пробирку с 2 мл соответствующего бульона и инкубировали 4 ч при температуре 37°C. Затем осуществляли посев на питательный агар Мюллера-Хинтона (HiMedia Laboratories, Индия) для *S.aureus* и ГРМ-агар с добавлением 5% лошадиной крови (ЗАО «ЭКОлаб») для *S.pneumoniae*. Чашки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37°C (в 5,5% CO₂ среде для *S.pneumoniae*). В исследовании использовали второй пассаж бактерий после регенерации штамма. Рабочие разведения бактериальной суспензии готовили с использованием денситометра Densi-La-Meter («PLIVA-Lachema Diagnostika», Словакия). За 1x10⁹ бактерий в 1 мл объема принимали 0,8 ЕД мутности по McFarland.

Мышей (BALB/C, самки, массой 20-22 г) получали из питомника «Андреевка» (Московская обл.) и содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария. Мышей инфицировали интраназально под легким наркозом указанными в каждом эксперименте дозами вирусов гриппа. Далее на 4 день после вирусного заражения мышей инфицировали повторно интраназально различными дозами *S.pneumoniae* и *S.aureus* (в объеме 0,05 мл). Клиническую тяжесть инфекции у животных оценивали, учитывая смертность от инфекции и изменение веса, которое рассчитывали, как описано [2]. В указанные дни после инфицирования в каждой группе забивали по три мыши, в стерильных условиях извлекали легкие. После манипуляций, описанных в [2], супернатант отбирали для определения бактериальной плотности и определения инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK в 96-луночных планшетах, как описано в [2]. Титр вируса определяли по 4 повторностям каждой пробы и выражали в lgТЦИД₅₀/0,1 мл.

Для определения плотности бактерий из полученных образцов гомогенизированных легких готовили серийные разведения и осуществляли прямой высеv на чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтона для *S.aureus* и ГРМ-агар с добавлением 5% лошадиной крови для *S.pneumoniae*. Учет КОЕ проводили после 18 часов инкубации при температуре 37°C (в 5,5% CO₂ среде для *S.pneumoniae*). Количество выросших колоний умножали на степень разведения и коэффициент, обратный количеству посеянного материала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов была изучена патогенность вирусов гриппа, далее использованных для разработки экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции. Для проведения экспериментов нами были использованы вирусы гриппа подтипа H1N1: адаптированный к мышам пандемический, А/Калифорния/04/2009 МА, лабораторный штамм вируса гриппа А/Пуэрто Рико /8/34, известного своей вирулентностью для мышей, и их реассортанта NIBRG-121хр (А/Калифорния/04/2009 Х А/Пуэрто Рико /8/34 (2:6), содержащий поверхностные белки HA и NA от А/Калифорния/04/2009, а внутренние белки от А/Пуэрто Рико /8/34. В предварительных опытах были определены для каждого вируса летальные дозы на мышах (МЛД₅₀) и выражены в ТЦИД₅₀. Изучение патогенности вирусов у мышей проводили при заражении мышей 5 МЛД₅₀ вирусов А/Калифорния/04/2009МА, А/Пуэрто Рико /8/34, NIBRG-121хр или аллантоисным вирусом А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009). На 5 день после инфицирования у животных получали легкие и определяли в них титр вируса в культуре клеток MDCK, а также фиксировали потерю веса в каждой группе мышей.

Проведенные нами исследования показали, что инфицирование вирусом А/Пуэрто Рико /8/34 приводило к смертности мышей, значительной потере веса (22%) и вирусной репродукции в легких животных. Пандемический вирус гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) без предварительной адаптации к мышам не обладал летальной активностью, что коррелировало с его низкой репро-

дукцией в легких, однако проведенная нами адаптация этого вируса путем 5 пассажей через легкие мышей привела к получению патогенного варианта, инфицирование которым вызывало смертность животных, потерю ими веса (23%), а также репродукцию вируса в легких. В результате была создана модельная пара вирусов А/Калифорния/04/2009МА и А/Пуэрто Рико /8/34, достоверно не отличающихся по летальной и репродукционной активности у мышей. В качестве третьего модельного вируса был использован реассортант NIBRG-121хр (А/Калифорния/04/2009ХА/Пуэрто Рико /8/34 (2:6), содержащий поверхностные белки HA и NA от не адаптированного к мышам вируса А/Калифорния/04/2009, а внутренние белки от А/Пуэрто Рико /8/34. Несмотря на то, что реассортант вызывал смертность животных, он обладал меньшей патогенностью по сравнению с родительскими штаммами.

Для моделирования инфекции использовались сублетальные заражающие дозы (0,5 МЛД₅₀) трех вирусов: А/Калифорния/04/2009МА, А/Пуэрто Рико /8/34 и NIBRG-121хр. Живые культуры *S. aureus* вводили в одинаковых дозах для заражения. Несмотря на признаки болезни, а также незначительную потерю веса, в группах мышей, зараженных вирусами или бактериями отдельно, все животные остались живы в течение всего периода наблюдения (табл. 1). Полная или частичная гибель наблюдалась в группах, зараженных изученными штаммами *S. aureus* после инфицирования всеми вирусами, за исключением вакцинного штамма *S. aureus* №1986, который вызывал гибель животных только при инфицировании их А/Калифорния/04/2009МА. Процент смертности и потеря веса в группах зависели от штаммов обоих патогенов. Полная гибель животных с наибольшей потерей веса наблюдалась в группе, инфицированной А/Пуэрто Рико /8/34 с последующим заражением *S.aureus* №884, при индуцировании бактериальной пневмонии *S.aureus* №329 смертность была ниже. При заражении NIBRG-121хр с последующим инфицированием *S.aureus* №329 или *S.aureus* №884 смертность животных и потеря веса были ниже по сравнению с аналогичными группами, зараженными А/Пуэрто Рико /8/34, но при этом, как и в случае с А/Пуэрто Рико /8/34, наибольшая смертность (75%) наблюдалась при последовательном заражении вирусом и *S.aureus* №884. При последовательном заражении вакцинным штаммом *S. aureus* №1986 после инфицирования вирусами NIBRG-121хр или А/Пуэрто Рико /8/34, несмотря на фиксируемое снижение веса, все животные оставались живы. Определение титра вируса и плотности бактерий в легких животных выявило, что эти показатели при заражении каждым из патогеном отдельно во всех случаях были достоверно ниже, чем при комбинированном зара-

Таблица 1. Влияние комбинированного заражения различными штаммами *S.aureus* после гриппозной инфекции, вызванной вирусами гриппа H1N1

Схемы заражения	Выживаемость (%)	Титр вируса (lgТЦИД ₅₀)	Плотность бактерий (lg КОЕ/мл) в легких
А/Калифорния/04/09МА+ <i>S.aureus</i> 1986	20	5,2±0,2	3,5±0,5
А/Пуэрто Рико /8/34+ <i>S.aureus</i> 1986	100	2,5±0,5	0,5±0,5
Реассортант NIBRG-121хр+ <i>S.aureus</i> 1986	100	2,3±0,4	0,5±0,5
А/Пуэрто Рико /8/34+ <i>S.aureus</i> 884	0	5,3±0,8	4±0,5
А/Пуэрто Рико /8/34+ <i>S.aureus</i> 329	25	5,2±0,3	2,9±0,8
Реассортант NIBRG-121хр+ <i>S.aureus</i> 884	25	4,7±0,8	3,0±0,6
Реассортант NIBRG-121хр+ <i>S.aureus</i> 329	30	4,8±1,0	2,9±0,7
А/Калифорния/04/2009 МА	100	1,8±0,4	-
А/Пуэрто Рико /8/34	100	1,2±0,5	-
Реассортант NIBRG-121хр	100	0,8±0,8	-
<i>S. aureus</i> 1986	100	-	0,72±0,12
<i>S. aureus</i> 329	100	-	0,9±0,3
<i>S.aureus</i> 884	100	-	1,2±0,2

Примечание. В опытах все штаммы использовали для заражения в одинаковых дозах: *S. aureus* 2х10¹⁰ КОЕ/мл, вирусы в дозе 0,5 МЛД₅₀/0,1мл.

жении (табл.1). Однако при использовании для индуцирования вторичной пневмонии вакцинного штамма *S. aureus* № 1986 титр вируса и плотность бактерий были значительно выше при заражении вирусом А/Калифорния/04/2009 МА, чем при заражении NIBRG-121хр или А/Пуэрто Рико /8/34, что соответствовало данным по смертности животных. Кроме того, плотность бактерий при заражении *S. aureus* №884 была выше, чем в аналогичных группах животных, инфицированных *S. aureus* №329, что также коррелировало с данными по смертности мышей.

Для индуцирования вторичной бактериальной пневмонии использовали *S. pneumoniae* и сублетальные дозы вирусов гриппа (0,5МЛД₅₀) А/Калифорния/04/2009 МА, А/Пуэрто Рико /8/34 и NIBRG-121хр, заражение каждым из которых по отдельности вызывало заболевание у мышей, но не приводило к смертельным исходам. Введение отдельно живых культур *S. pneumoniae* в двух дозах (12,5х10⁶ и 25х10⁶ КОЕ/мл) вызывало гибель 20 и 40% животных соответственно (табл. 2). Последовательное заражение *S. pneumoniae* в обоих дозах после гриппозной инфекции вирусами А/Калифорния/04/2009 МА или А/Пуэрто Рико /8/34, сходными по своей патогенности, вызывало полную гибель мышей. При заражении менее патогенным NIBRG-121хр полная гибель животных наблюдалась при последующем заражении *S. pneumoniae*, в дозе 25х10⁶ КОЕ/мл, снижение дозы заражения *S. pneumoniae* до 12,5х10⁶ КОЕ/мл приводило к снижению гибели и выживанию 25% мышей. Изучение легких мышей выявило, что для всех трех вирусов титр при заражении ими отдельно был достоверно на 2-3 lgТЦИД₅₀ ниже, чем при комбинированном заражении. Несмотря на гибель животных во всех группах, зараженных *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, размножение вируса в легких животных, инфицированных А/Калифорния/04/2009МА, было значительно выше, чем в аналогичных группах, зараженных А/Пуэрто Рико /8/34 и NIBRG-121хр. Плотность бактерий в высеве из легких при комбинированном заражении была примерно в 100 раз выше, чем при отдельном заражении обеими дозами *S. pneumoniae* (табл. 2).

Совокупность полученных данных в разработанной модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной различными штаммами *S. aureus* и *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, позволяет выявить ряд различий в протекании и исходе пневмоний, вызванных как отдельно вирусами гриппа или бактериями, так и их сочетанием. В задачу исследования входило использование в качестве триггеров бактериальной инфекции вирусов гриппа H1N1, сопостави-

Таблица 2. Влияние комбинированного заражения различными дозами *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, вызванной вирусами гриппа H1N1

Схемы заражения	Выживаемость (%)	Титр вируса в легких (lgТЦИД ₅₀)	Плотность бактерий в легких (lg КОЕ/мл)
А/Калифорния/04/09МА+ <i>S. pneumoniae</i> 12,5х10 ⁶ КОЕ/мл	0	4,0±2,0	8,51±0,19
А/Калифорния/04/09МА + <i>S. pneumoniae</i> 25х10 ⁶ КОЕ/мл	0	4,5±2,3	8,93±0,13
А/Пуэрто Рико /8/34+ <i>S. pneumoniae</i> 12,5х10 ⁶ КОЕ/мл	0	2,7±0,3	8,64±0,02
А/Пуэрто Рико /8/34+ <i>S. pneumoniae</i> 25х10 ⁶ КОЕ/мл	0	3,7±0,8	8,63±0,59
NIBRG-121хр+ <i>S. pneumoniae</i> 12,5х10 ⁶ КОЕ/мл	25	2,3±0,3	8,21±0,23
NIBRG-121хр+ <i>S. pneumoniae</i> 25х10 ⁶ КОЕ/мл	0	3,2±1,0	8,21±0,12
А/Калифорния/04/2009 МА	100	1,8±0,4	-
А/Пуэрто Рико /8/34	100	1,5±0,5	-
NIBRG-121хр	100	1,0±1,0	-
<i>S. pneumoniae</i> 12,5х10 ⁶ КОЕ/мл	80	-	6,67±0,58
<i>S. pneumoniae</i> 25х10 ⁶ КОЕ/мл	60	-	7,87±0,03

мых по параметрам патогенности для мышей. С этой целью нами были выбраны классический лабораторный штамм А/Пуэрто Рико /8/34 (H1N1) и адаптированный к мышам штамм А/Калифорния/04/2009 МА (пндмH1N1 2009). Исходный изолят пандемического вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндмH1N1 2009) не обладал летальной активностью у мышей. Однако, после пассажей через легкие мышей вирус приобрел патогенные свойства, схожие с вирусом А/Пуэрто Рико /8/34 (H1N1), что, вероятно, объясняется приобретением им при пассировании мутации D222G в HA, которая обнаруживается в большинстве адаптированных к мышам вирусам А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) [1] и ассоциирована с тяжелыми и смертельными исходами от пневмоний после пандемического гриппа у людей [4]. Реассортант NIBRG-121хр (А/Калифорния/04/2009 Х А/Пуэрто Рико /8/34), содержащий поверхностные белки HA и NA от не адаптированной к мышам А/Калифорния/04/2009, а внутренние белки от А/Пуэрто Рико /8/34, обладал несколько меньшей патогенностью по сравнению с А/Калифорния/04/2009 МА и А/Пуэрто Рико /8/34, что, возможно, связано с наличием у него HA от неадаптированного вируса А/Калифорния/04/2009(пндм H1N1 2009). При моделировании вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S.aureus* №329, *S.aureus* №884 и *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, наблюдалось увеличение смертности мышей по сравнению с инфекцией, вызванной каждым из патогенов в отдельности, что ассоциировалось с увеличением титра вируса и плотности бактерий в легких. Исключением явился наименее патогенный для мышей вакцинный штамм *S. aureus* №1986, который не вызывал смертности при инфицировании животных вирусами А/Пуэрто Рико /8/34 и NIBRG-121хр, но приводил к их гибели при инфицировании не отличающимся от них по патогенности вирусом А/Калифорния/04/2009МА. Кроме того, у животных, зараженных *S. pneumoniae* после инфекции их А/Калифорния/04/2009МА, размножение вируса в легких было значительно выше, чем в аналогичных группах, зараженных А/Пуэрто Рико /8/34 и NIBRG-121хр. Данный факт позволяет предположить, что пандемический штамм А/Калифорния/04/2009МА обладает более сильными факторами патогенности, повреждающими антибактериальную активность системы врожденного иммунитета, чем вирус А/Пуэрто Рико /8/34. Одним из таких факторов может являться минорный белок PB1-F2, обладающий про-апоптотической функцией в отношении фагоцитирующих лейкоцитов и способностью провоцировать вторичные бактериальные осложнения [5,6,10], первичная структура белка которого отличается у взятых в эксперимент лабораторного и пандемического штаммов [6]. Данная гипотеза требует дальнейшего изучения, предусматривающего использование в модели вторичной постгриппозной пневмонии рекомбинантных вирусов с различными модификациями белка PB1-F2. Разработанная нами модель постгриппозной пневмонии с использованием вирусов и бактериальных штаммов с различными свойствами является инструментом для дальнейших исследований в области определения факторов патогенности вируса гриппа, а также для создания нового поколения гриппозных вакцин, способных нивелировать повреждающую функцию факторов патогенности за счет индукции к ним иммунного ответа.

Работа выполнена при финансовой поддержки Российского Научного Фонда (грант № 18-45-05002 «Вирусоподобные частицы для борьбы с постгриппозными бактериальными инфекциями, 2018-2020 гг. »).

ЛИТЕРАТУРА

1. Краснослободцев К.Г., Львов Д.К., Альховский С.В., Бурцева Е.И., Федякина И.Т., Колобухина Л.В., Кириллова Е.С., Трушакова С.В., Осерко Т.А., Шелканов М.Ю., Дерябин П.Г. Полиморфизм аминокислот в позиции 222 рецепторсвязывающего сайта гемагглютинирина вируса гриппа А (H1N1)pdm09 у пациентов с летальной вирусной пневмонией 2012-2014 гг. Вопросы вирусологии. 2016, 61(4): 166-171.
2. Ленева И.А., Леонова Е.И., Махмудова Н. Р., Фалынскова И.Н., Федякина И.Т., Зверев В.В., Михайлова Н. А. Разработка экспериментальной модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии. Вопросы вирусологии. 2015, 60(5): 27-31.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1). United States, May-August 2009. MMWR 2009, 58:1-4.

4. Goka A. Mutations associated with severity of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in humans: a systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. *Archives of Virology*. 2014, 159(12):3167-3183.
5. Iverson A.R., Boyd K.L., McAuley J.L. et al. A. Influenza virus primes mice for pneumonia from *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 2011, 203(6):880-888.
6. Kamal R.P., Alymova I.V., York I.A. Evolution and Virulence of Influenza A Virus Protein PB1-F2. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 29 ;19(1).
7. Lee M.H., Arrecubieta C., Martin F.J. et al. A postinfluenza model of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J. Infect. Dis.* 2010, 201(4):508-515.
8. Legand A., Briand S., Shindo N. et al. Addressing the public health burden of respiratory viruses: the Battle against Respiratory Viruses (BRaVe) Initiative. *Future Virology*. 2013, 8(10): 953-968.
9. McCullers J.A. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19(3):571-582.
10. McAuley J.L., Hornung F., Boyd, K.L. et al. J.A. Expression of the 1918 influenza a virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell. Host. Microbe*. 2007, 2:240-249.
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):341-350.
12. 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):962-970.
13. Murray R.J., Robinson J.O., White J.N. et al. Community-acquired pneumonia due to pandemic A(H1N1)2009 influenza virus and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* co-infection. *PLoS One*. 2010, 5(1):e8705.
14. Potter C.W. Chronicle of influenza pandemics. *In: Nicholson K.G., Webster R.G., Hay A.J. (eds). Textbook of Influenza*. London: Blackwell Scientific Publications, 1998:3-18.
15. Shindo N. Making progress on the WHO Public Health Research Agenda for Influenza. *Influenza Other Respi. Viruses*. 2013, 7(2):1-3.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Н.А.Михайлова, Е.М.Зими́на, А.В.Солдатенкова, А.А.Калошин

РАЗРАБОТКА ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Получение, исследование и отбор рекомбинантных антигенов для включения в состав антисинежной вакцины. *Материалы и методы.* При использовании в качестве матрицы геномной ДНК *Pseudomonas aeruginosa*, в результате ПЦР синтезированы гены, кодирующие одни из наиболее изученных антигенов микроорганизма, в частности белки F, L и I наружной мембраны и экзотоксин А. Амплифицированные последовательности клонированы в плазмидных векторах, предназначенных для экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Синтезированные в результате экспрессии рекомбинантные белки очищали в колонках с никель-активированным сорбентом. Подлинность рекомбинантных антигенов оценивали электрофорезом и иммуноблоттингом. При оценке иммуногенности рекомбинантных белков их сорбировали на гидроокиси алюминия и использовали для внутрибрюшинной иммунизации мышей с последующим внутрибрюшинным введением живой вирулентной культуры или экзотоксина А. *Результаты.* Полученные рекомбинантные белки наружной мембраны OprF, OprL и OprI, а также делеционный вариант экзотоксина А (анатоксин) стимулировали иммунные реакции и защищали экспериментальных животных от вирулентной культуры *P. aeruginosa*. При использовании комплексов рекомбинантных белков, а также при иммунизации слитыми белками, состоящими из последовательностей двух или трех рекомбинантных антигенов, наблюдалось аддитивное увеличение защитных эффектов. Наиболее эффективными оказались комбинация рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина (индекс эффективности защитных свойств (ИЭ 3,0) и два слитых рекомбинантных белка (ИЭ 3,5). Первый слитый рекомбинантный белок (OprF-аТох-OprI) состоял из слитых полипептидных последовательностей OprF, анатоксина и OprI, а второй — из слитых полипептидных последовательностей OprF и OprI. *Заключение.* Полученные данные показали принципиальную