

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

возможность использования слитых рекомбинантных белков OprF-aTox-OprI и OprF-OprI, а также комплекса рекомбинантных OprF и анатоксина в качестве кандидатов антисинегнойных вакцин.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 74—80

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, белки наружной мембраны, OprF, OprL, OprI, экзотоксин А, анатоксин

*N.A.Mihailova, E.M.Zimina, A.V.Soldatenkova, A.A.Kaloshin*

## DEVELOPMENT OF THE VACCINE BASED ON THE RECOMBINANT ANTIGENS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* The aim is obtaining, investigation and selection of recombinant antigens for inclusion theirs into the against *Pseudomonas* vaccine. *Materials and methods.* The genes encoding of the outer membrane proteins F, L and I and Exotoxin A were synthesized by PCR with the genomic DNA of *Pseudomonas aeruginosa*. The amplified sequences were cloned into plasmid vectors for expression in cells of *Escherichia coli*. As the result of expression were the synthesized recombinant proteins that were purified in columns with a nickel-activated sorbent. The authenticity of the recombinant antigens was assessed by electrophoresis and immunoblotting. For assessing the immunogenicity of the recombinant proteins, they were sorbed on aluminum hydroxide and used for intraperitoneal immunization of mice. After a course of immunization, mice were injected intraperitoneally with a live virulent culture or exotoxin A. *Results.* The obtained recombinant outer membrane proteins OprF, OprL and OprI, as well as the deletion variant of exotoxin A (toxoid) stimulated immune reactions and protected the experimental animals from the virulent culture of *P. aeruginosa*. Using of the complexes of the recombinant proteins, as well as immunization with the fusion proteins consisting from sequences of two or three recombinant antigens, produced an additive increase in protective effects. The combination of the recombinant OprF protein and the recombinant toxoid (efficiency index of protective properties (EI 3.0) and two recombinant fusion proteins (EI 3.5) were the most effective. The first recombinant fusion protein (OprF-aTox-OprI) consisted from fused polypeptide sequences of OprF, toxoid and OprI. The second recombinant fusion protein (OprF-OprI) consisted from fused polypeptide sequences of OprF and OprI. *Conclusion.* The data obtained showed the fundamental possibility of using recombinant fusion proteins OprF-aTox-OprI and OprF-OprI as well as the complex of the recombinant OprF protein and the recombinant toxoid as the candidated vaccines against *Pseudomonas aeruginosa*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019 No. 1, P. 74—80

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, outer membrane proteins, OprF, OprL, OprI, exotoxin A, toxoid

## ВВЕДЕНИЕ

Синегнойные инфекции широко распространены в стационарах различного профиля. Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) стабильно занимает второе-третье место среди возбудителей оппортунистических инфекций, предпосылками для развития которых являются ослабление иммунной системы больного и высокая резистентность патогена к широкому кругу химиотерапевтических средств, применяемых в клиниках [2, 8]. Этими обстоятельствами объясняется низкая эффективность антибиотиков третьего и четвертого поколения, а также высокая летальность при синегнойных осложнениях. Одним из путей решения этой проблемы может явиться создание специфических иммунобиологических средств, в частности, вакцин [1, 9].

Разработки антисинегнойных вакцин активно проводились с 70-х годов XX века. В первую очередь, рассматривалась перспектива препаратов на основе цельных инактивированных клеток. В качестве примера можно привести советскую вакцину, содержащую семь штаммов, представителей основных иммунотипов *P. aeruginosa*, циркулирующих в стационарах [7]. Однако, эти препараты не были внедрены в практику здравоохранения из-за высокой токсичности. Поэтому были созданы вакцины

на основе разрушенных микробных клеток [6, 12], которые, несмотря на высокую иммуногенность, проявляли реактогенность, связанную с примесью липополисахарида клеточной стенки бактерии. Обнадёживающие результаты были получены при исследовании препаратов на основе очищенных белков наружной мембраны (outer membrane protein — Opr) с молекулярной массой в пределах от 10 до 100 кДа, которые обладали выраженным протективными свойствами и низкой токсичностью [3, 10, 12]. Значимыми, на наш взгляд, являются исследования по созданию препаратов анатоксина *P. aeruginosa* — химически детоксицированного экзотоксина А, одного из основных факторов патогенности синегнойной палочки [9]. Анатоксин использовали в клинике с целью получения донорской плазмы, которая оказалась высокоэффективной при лечении генерализованных форм заболеваний, вызываемых *P. aeruginosa* [4, 5].

Следует подчеркнуть, что сложности в создании эффективных вакцин, предназначенных для профилактики синегнойной инфекции, связаны с наличием многочисленных факторов патогенности у возбудителя, среди которых выделить наиболее значимые для формирования специфического иммунитета представляется сложной задачей. Содержание белковых антигенов в бактериальной клетке достаточно мало, процесс их очистки сложен, а в случае получения анатоксина остается вероятность реверсии токсичности. Поэтому использование традиционных трудоемких технологий представляется мало приемлемым. Выходом из данной ситуации может явиться использование генно-инженерных технологий, позволяющих получать рекомбинантные белки. Соответственно, целью проведенных исследований явилось получение и отбор рекомбинантных антигенов, способных стимулировать иммунные реакции и защищать экспериментальных животных от вирулентной культуры *P. aeruginosa*. В качестве кандидатных компонентов разрабатываемой вакцины выбраны антигены — наиболее изученные поверхностные белки OprF, OprL и OprI, а также экзотоксин А. На основе полученных продуктов предполагалось создать кандидатную синегнойную вакцину и изучить ее свойства.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Последовательности целевых генов амплифицировали с помощью ПЦР, используя специфические праймеры, подобранные на основе полноразмерной последовательности штамма *P. aeruginosa* PA-01, представленной в базе данных GenBank [13]. В качестве матрицы использовали геномную ДНК, выделенную из штамма *P. aeruginosa* PA-103.

Амплифицированные последовательности встраивали в плазмидные векторы, несущие регуляторные участки для экспрессии в клетках *Escherichia coli*, используя рестриктазы, сайты которых были введены в концевые области праймеров для ПЦР. При встраивании использовали плазмиды pQE-30 (QIAGEN) и pET-28b(+) (Novagen). В первом случае рекомбинантными конструкциями трансформировали клетки *E. coli* штамма M15 (QIAGEN), а во втором случае — клетки штамма BL21(DE3). Первичный отбор клонов проводили с использованием рестриктового анализа. Окончательно отбор проводился секвенированием по Сэнгеру.

Синтез рекомбинантных белков с использованием созданных продуцентов проводили путем индукции экспрессии с помощью изопропил- $\beta$ -d-тиогактопиранозидом. Белковые продукты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли [11].

Очистку рекомбинантных белков осуществляли методом хелатной хроматографии с использованием Ni-сефарозы (Amersham) в 8 М буферном растворе мочевины. Для перевода белков в нативное состояние использовали диализ против 50 мМ раствора Tris-HCl (рН 9,0). Содержание белков определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. При расчете концентрации рекомбинантных белков использовали коэффициенты экстинкции, рассчитанные в программе OMIGA.

Подлинность рекомбинантных белков подтверждали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Лэммли и имму-

ноблоттинга, проводимых в соответствии с общепринятыми методиками [11]. При иммуноблоттинге использовали кроличьи сыворотки крови против цельноклеточной культуры *P. aeruginosa*.

Рекомбинантные белки для иммунизации животных разводили в фосфатно-солевом буфере с добавлением гидроокиси алюминия из расчета 3 мг  $Al(OH)_3$  на 1 мг белка и проводили сорбцию в течение 12 часов при температуре 4°C. Препараты вводили мышам весом 16-18 г внутривентриально в объеме 0,5 мл двукратно с двухнедельным интервалом. Через две недели после курса иммунизации животным вводили культуру *P. aeruginosa* (штаммы PA-170015, PA-103), либо рекомбинантный экзотоксин А. ЛД<sub>50</sub> вычисляли по формуле Кербера в модификации Ашмарина — Воробьева:  $LD_{50} = 10^{(lgA - lg2 \times (B_1/C_1 + B_2/C_2 + B_3/C_3 + B_4/C_4 + B_5/C_5 - 0,5))}$ ; где А — максимальная инфекционная доза в опыте, В — количество животных, павших в группе, С — первоначальное количество животных в группе.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ПЦР синтезированы последовательности генов мембранных белков: *oprF* (размер 1053 н.п.), *oprL* (размер 507 н.п.), *oprI* (размер около 252 н.п.). Все последовательности были встроены в полилинкер плазмиды pQE-30. В результате экспрессии рекомбинантных генов синтезированы и очищены в колонках с никель-активированным сорбентом специфические рекомбинантные продукты. При анализе в полиакриламидном геле выявили рекомбинантные продукты со следующими примерными молекулярными массами: 40 кДа у *OprF* (расчетная масса 38,9 кДа), 20 кДа у *OprL* (расчетная масса 19,2 кДа) и 10 кДа у *OprI* (расчетная масса 10,1 кДа). Все рекомбинантные белки проявили высокую специфичность при взаимодействии с поликлональной иммунной кроличьей сывороткой к цельным клеткам *P. aeruginosa*.

Клонирование экзотоксиновой последовательности проводили, используя плазмидный вектор pET-28b(+). В первую очередь, была получена конструкция с полноразмерным геном *toxA* (2 kb), продукт экспрессии которого (экзотоксин А) оказался высокотоксичным для мышей. Далее с помощью специфических рестриктаз (*HindIII* и *XhoI*), вырезали из гена *toxA* фрагмент размером 1598 н.п., встроили его в плазмиду pET-28b(+). Синтезированные и очищенные рекомбинантные экзотоксин А (73,8 кДа) и анатоксин (65,8 кДа) оказались специфичными в иммуноблоттинге при реакции с кроличьей сывороткой против синегнойного анатоксина.

На первом этапе при исследовании защитных свойств мембранных белков использовали живую вирулентную нетоксигенную культуру *P. aeruginosa* штамма PA-170015, а при исследовании анатоксина — полученный рекомбинантный экзотоксин А *P. aeruginosa*. Иммунизацию мышей осуществляли, используя дозы рекомбинантных белков с двукратным шагом от 6,25 до 50 мкг. Данные учета павших в течение недели животных свидетельствовали о способности препаратов защищать мышей от синегнойной инфекции. При заражении бактериальной культурой животным контрольных групп (интактные мыши той же партии) вводили от 25 до 400 микробных клеток (м.к.), а иммунизированным мышам от 50 до 800 млн м.к. Индексы эффективности (ИЭ) защитных свойств (отношение ЛД<sub>50</sub> для иммунизированных мышей к ЛД<sub>50</sub> в контрольной группе) рекомбинантного белка *OprF* составляли от 1,6 до 3,3. Оптимальная иммунизирующая доза соответствовала 25 мкг препарата. Для рекомбинантного белка *OprL* оптимальной иммунизирующей дозе также соответствовало 25 мкг белка с ИЭ равным 3,0. При оценке защитных свойств *OprI*, иммунизацию проводили с использованием доз 50 и 25 мкг и эффективной оказалась только доза 50 мкг со значением ИЭ 2,0 (табл. 1).

Мыши, иммунизированные анатоксином, проявили высокую выживаемость после введения полноразмерного рекомбинантного экзотоксина А. Рекомбинантный экзотоксин А вводили иммунизированным животным в дозах от 6,25 до 100 мкг на особь, а в контрольной группе — от 1,56 до 25 мкг. Оптимальная иммунизирующая доза для рекомбинантного анатоксина соответствовала 50 мкг белка на особь с индексом эффективности 8,9 (табл. 1).

Таблица 1. Защитные свойства рекомбинантных белков наружной мембраны от культуры *P. aeruginosa* штамма PA-170015

Вводимые препараты	Доза, мкг	ЛД <sub>50</sub> , млн м.к. <i>P. aeruginosa</i> или мкг экз. А		ИЭ
		В опытных группах	В контрольных группах	
OprF	50	162,5	66	2,5
	25	214,4		3,3
	12,5	141,4		2,1
	6,25	107,2		1,6
OprL	50	206	73	2,8
	25	222		3
	12,5	187		2,6
	6,25	148		2
OprI	50	141,7	70,7	2,0
	25	114,9		1,6
Анатоксин	50	55,0	6,2	8,9
	25	31,6		5,1
	12,5	13,6		2,2
	6,25	9,3		1,5

OprF-OprI, 103,6 кДа для OprF-aTox и 107,2 кДа для OprF-aTox-OprI. При анализе в иммуноблоттинге слитые белки оказались специфичными при взаимодействии с сыворотками, иммунными к отдельным рекомбинантным белкам: OprF-OprI реагировал с сыворотками к OprF и OprI; OprF-aTox — с сыворотками к OprF и анатоксину; OprF-aTox-OprI — со всеми тремя сыворотками.

При исследовании защитных свойств слитых рекомбинантных белков и комплексов отдельных рекомбинантных белков в качестве материала для экспериментального заражения использовали культуру *P. aeruginosa* штамма PA-103, который характеризуется всеми основными факторами патогенности. Иммунизированным мышам вводили от 12,5 до 100 млн м.к., а группе контрольных неиммунизированных животных той же партии — от 6,25 до 50 млн м.к. живой вирулентной культуры *P. aeruginosa*. Наиболее эффективными оказались препараты OprF-aTox-OprI и OprF-OprI, с оптимальными дозами иммунизации в 50 мкг для первого слитого белка и 25 мкг — для второго.

При эксперименте по исследованию комплексов рекомбинантных белков изучили следующие смеси: OprF + OprL, OprF + анатоксин и OprF + OprL + анатоксин. Помимо группы интактных животных присутствовали еще три контрольные группы животных, которых иммунизировали рекомбинантными белками по отдельности. Рекомбинантные белки вводили с использованием оптимальных доз, подобранных на первом этапе исследований: OprF и OprL вводили в дозе 25 мкг, а анатоксин в дозе 50 мкг. Из результатов эксперимента видно, что все рекомбинантные белки в результате иммунизации в два раза увеличивали выживаемость мышей, инфицированных *P. aeruginosa* штамма PA-103. Тот же самый результат наблюдали при введении смеси двух мембранных белков (OprF + OprL). В то же время, использование смесей OprF + анатоксин и OprF + OprL + анатоксин приводило к аддитивному защитному эффекту с индексом эффективности 3,0 (табл. 2).

В результате проведенных исследований получены штаммы-продуценты ряда рекомбинантных белков наружной мембраны и анатоксина *P. aeruginosa*. Отработана технология очистки белков (OprF, OprL, OprI, анатоксин) и изучены их иммуногенные свойства. После иммунизации животных выявлены наиболее выраженные протективные свойства от синегнойной инфекции у рекомбинантных белков OprF, OprL и анатоксина. Рекомбинантный белок OprI обладал низкой иммуногенностью даже при введении увеличенной дозы что, вероятно, связано с его малым молекулярным весом. С целью исключения возможного влияния токсических факторов патогенности возбудителя в экспериментах с мембранными белками использован штамм PA-170015, характеризующийся отсутствием синтеза экзотоксина. При исследовании протектив-

Далее представляло интерес исследовать комплексное взаимодействие наиболее эффективных антигенов, что можно было достигнуть двумя путями: использованием комплексов отдельных белков или созданием слитых белков.

При создании слитого белка OprF-OprI последовательность гена oprI, кодирующую 192-342 аминокислотные остатки OprI, встроили в рекомбинантную плазмиду, несущую экспрессирующий ген oprF. При создании слитого белка OprF-aTox последовательность гена oprF встроили в рекомбинантную плазмиду для экспрессии рекомбинантного анатоксина. Далее с целью получения слитого белка OprF-aTox-OprI во вторую рекомбинантную конструкцию встроили последовательность гена oprI.

По результатам электрофореза в полиакриламидном геле выявлено, что полученные рекомбинантные белки соответствовали расчетным данным: 46,8 кДа для

ных свойств анатоксина использовали рекомбинантный экзотоксин А или штамм PA-103 *P. aeruginosa*, обладающий высокой токсичностью.

Ключевая цель при разработке рекомбинантной антисинегнойной вакцины заключается в создании препарата, который должен, с одной стороны, вызывать иммунные реакции против поверхностных антигенов возбудителя, а с другой стороны, способствовать нейтрализации одного из самых серьезных факторов патогенности — экзотоксина А. Данную задачу можно решить двумя путями: использованием комплекса отдельных белков или получением слитых вариантов, используя для заражения культуру *P. aeruginosa* штамма PA-103.

При комплексном использовании рекомбинантных белков OprF и анатоксина выявлен аддитивный эффект. Включение в состав смеси компонента OprL не приводило к усилению защитных свойств.

Полученные слитые варианты рекомбинантных белков (OprF-OprI, OprF-aTox, OprF-aTox-OprI) также обладали более высокими иммуногенными свойствами по сравнению с отдельными рекомбинантными белками. Среди слитых вариантов наиболее выраженным защитным эффектом обладали OprF-OprI и OprF-aTox-OprI. Таким образом, можно сделать вывод, что комплекс двух рекомбинантных белков (OprF и анатоксина) и слитые рекомбинантные белки могут быть использованы при создании антисинегнойной вакцины.

Кандидатная вакцина, полученная на основе комплекса рекомбинантных белков OprF и анатоксина, сорбированных на геле гидроокиси алюминия, в настоящее время проходит доклинические испытания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Благовидов Д.А., Костинов М.П., Симонова О.И. и др. Переносимость вакцины против *P. aeruginosa* у детей с муковисцидозом и врожденными пороками развития легких. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016, 2 (87):55-66.
2. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А. и др. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015, 17(3):170-186.
3. Макаренко Т.А., Станиславский Е.С. Иммунологическое изучение белков клеточной стенки *Pseudomonas aeruginosa*. Журнал микробиол. 1996, 2: 7-9.
4. Михайлова Н.А., Шаймухаметов Ф.А., Кузнецова Т.Н., Мороз А.Ф. Пат. 1481962 С СССР А61К35/74. Способ обезвреживания очищенного экзотоксина А синегнойной палочки. Заявл. 15.07.87; опубл. 09.06.95.
5. Подгорная Л.Г., Дзюбан Н.Ф. Антигенные свойства анатоксина синегнойной палочки и протективное действие антитоксической противосинегнойной сыворотки. Журнал микробиол. 1986, 6:67-69.
6. Станиславский Е.С., Жоо И., Северцева М.К. и др. Иммунологическая эффективность и безвредность в эксперименте проиммуногена-вакцины против инфекции *Pseudomonas aeruginosa*. Журнал микробиол. 1982, 5:70-75.
7. Титова Т.И., Сидорова Т.Н., Радкевич С.А. и др. Получение и изучение свойств поливалентной корпускулярной синегнойной вакцины. Журнал микробиол. 1985, 8:80-8.
8. Chatterjee M., Anju C.P., Biswas L. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. Int. J. Med. Microbiol., 2016, 306(1):48-58.

Таблица 2. Защитные свойства рекомбинантных белков от культуры *P. aeruginosa* штамма PA-103

Вводимые препараты в дозе, мкг	ЛД <sub>50</sub> , млн м.к. <i>P. aeruginosa</i>		ИЭ
	В опытных группах	В контрольных группах млн. м.к.	
OprF-aTox, 50	40,6	15,4	2,6
OprF-aTox, 100	31,0		2,0
OprF-aTox-OprI, 50	53,6		3,5
OprF-aTox-OprI, 100	35,4		2,3
OprF-OprI, 50	50,0		3,3
OprF-OprI, 25	53,6		3,5
Анатоксин, 50	61,6	20,3	3,0
OprF, 25			
OprL, 25			
Анатоксин, 50	46,7		2,3
OprL, 25			
Анатоксин, 50	61,6		3,0
OprF, 25			
OprL, 25	43,5		2,1
OprF, 25	40,6		2,0
OprL, 25	43,6		2,2
Анатоксин, 50	37,0		1,9

9. Doring G., Pier G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*. 2008, 26(8):1011-1024.
10. Lee N.G., Jung S.B., Ahn B.Y. et al. Immunization of burn-patients with a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine elicits antibodies with protective efficacy. *Vaccine*. 2000, 18:1952-1961.
11. Sambrook J.F., Russell D.W. *Molecular Cloning*, 2001.
12. Stanislavsky E.S., Joo I., Mashilova G.M. et al. Vaccines against *Pseudomonas aeruginosa* infection: 1. Experimental studies. *Vaccine*. 1985, Jun 3(2):128-36.
13. Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, complete genome. GenBank, Accession Number AE004091.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*М.И.Михайлов<sup>1</sup>, Е.Ю.Малинникова<sup>1</sup>, К.К.Кюрегян<sup>1</sup>, И.А.Потемкин<sup>1</sup>, Н.Д.Алсалих<sup>2</sup>, О.В.Исаева<sup>1</sup>, А.А.Карлсен<sup>1</sup>, В.С.Кичатова<sup>1</sup>, А.Д.Поляков<sup>3</sup>*

## ПАРАДОКС БАЛАЯНА

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, <sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, Москва; <sup>3</sup>Управление Роспотребнадзора по Белгородской области

В статье представлены результаты изучения эпидемиологии гепатита Е на территории Российской Федерации. Получены данные, объясняющие феномен, известный как парадокс Балаяна — широкое распространение анamnестических тел к вирусу гепатита Е при отсутствии регистрируемой заболеваемости. Показано, что завозные случаи инфекции не в состоянии поддержать эпидемиологический процесс гепатита Е на территории России. Большинство случаев ВГЕ-инфекции имеют автохтонный характер и связаны с зоонозной передачей вируса 3 генотипа от свиней.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 80—85

Ключевые слова: гепатит Е, вирус гепатита Е, антитела, пути передачи, зооноз

*M.I.Mikhailov<sup>1</sup>, E.Yu.Malinnikova<sup>1</sup>, K.K.Kyuregyan<sup>1</sup>, I.A.Potemkin<sup>1</sup>, N.D.Alsalikh<sup>2</sup>, O.V.Isaeva<sup>1</sup>, A.A.Karlsen<sup>1</sup>, V.S.Kichatova<sup>1</sup>, A.D.Polyakov<sup>3</sup>*

## BALAYAN PARADOX

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Russian University of People Friendship, Moscow; Administration of the Rospotrebnadzor of Belgorod region

This article presents the results of a study of the epidemiology of hepatitis E in the Russian Federation. Obtained data explaining the phenomenon, known as the Balayan paradox — the wide distribution of anamnestic antibodies to the hepatitis E virus in the absence of a registered incidence. It was shown that imported cases of infection are not able to support the epidemiological process of hepatitis E in Russia. The most cases of HEV infection are autochthonous in nature and are associated with zoonotic transmission of genotype 3 virus from pigs.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 80—85

Key words: hepatitis E, hepatitis E virus, antibodies, transmission, zoonosis

## ВВЕДЕНИЕ

Столетний юбилей Института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова послужил поводом к подведению итогов и разработке новых направлений дальнейших исследований. Лаборатория вирусных гепатитов — одна из самых молодых в институте. Она была организована всего два с половиной года тому назад сотрудниками, перешедшими из Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, из лаборатории, которую ранее возглавлял академик РАМН М.С. Балаян, первооткрыватель вируса гепатита Е (ВГЕ) [9]. Это определило основное направление ис-