

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВ ГЕМОФИЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

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

Цель. Изучение иммунобиологической активности комплексного препарата, предназначенного для профилактики гемофильной инфекции. *Материалы и методы.* В работе использованы комплексный препарат, содержащий 1 мкг липоолигосахариды (ЛОС) и 10 мкг белоксодержащей фракции (БСФ), а также монопрепараты ЛОС, БСФ и препарат капсульного полисахарида. Для изучения протективной активности комплексного препарата аутобредным мышам массой 14–16 г вводили однократно внутримышечно 0,5 мл (доза) препарата. Через 10 дней животных заражали живыми культурами *Haemophilus influenzae* капсульного и бескапсульных штаммов в дозе 5×10^9 микр.кл./мышь. Уровень специфических антител у иммунизированных животных выявляли в непрямом варианте ИФА. Для изучения влияния комплексного препарата на развитие инфекционного процесса иммунизированных мышей интраназально заражали культурами капсульного и нетипируемого штаммов *H. influenzae*. Вскрытие животных проводили через 3, 24, 48 и 72 часа. Стерильно отобранный материал (ткань легкого) гомогенизировали, титровали, мерно высевали на чашки Петри и через 18–20 часов культивирования производили подсчет выросших колоний бактерий, после чего пересчитывали число бактерий на мышь. *Результаты.* Исследования показали, что комплексный препарат обеспечивал защиту 90–100% животных от штаммов возбудителя, использованных в опыте. Иммунизация мышей препаратом приводила к значимому увеличению уровня специфических антител, выявляемых в непрямом варианте ИФА. При интраназальном заражении в контрольной группе, начиная с третьих суток, наблюдалось размножение возбудителя в легких. При этом у иммунизированных мышей количество бактерий, высеваемых из ткани легких, было незначительным в те же сроки наблюдения. Практически у всех мышей контрольной группы возбудитель выделяли из лимфатических узлов, брыжейки, у иммунных мышей этот показатель был значимо ниже. *Заключение.* Комплексный препарат защищал животных от всех заражающих штаммов возбудителя. Динамика формирования инфекционного процесса напрямую зависела от развития иммунного ответа на введение комплексного препарата.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 111–115

Ключевые слова: гемофильная инфекция, комплексный препарат, перекрестная протективная активность, капсульный и бескапсульные штаммы

N.E.Yastrebova, M.M.Tokarskaya, S.I.Elkina, N.N.Ovechko, S.A.Baranovskaya

THE IMMUNOBIOLOGICAL ACTIVITY OF THE COMPLEX PREPARATION AGAINST *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* INFECTION

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. To study the immunobiological activity of the complex preparation for *Haemophilus influenzae* infections prevention. *Materials and methods.* We used the complex preparation, containing 1 mcg of lipooligosaccharide and 10 mcg of protein-containing fraction, lipooligosaccharide and protein-containing fraction monopreparations, and capsular polysaccharide preparation. For studying cross-protective activity of the complex preparation white outbred mice (weight 14–16 g) were intramuscularly immunized with a dose 0,5 ml. 10 days later the animals were inoculated with *H. influenzae* encapsulated and non-typed strains culture inoculum in a dose 5×10^9 microbial cells/mouse. The immunized animals specific antibodies level was determined by means of indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). For studying complex preparation's influence on the development of the infectious process immunized mice were intranasally inoculated with *H. influenzae* encapsulated and non-encapsulated strains. The mice dissections were performed in 3, 24 and 72 hours after inoculation. Sterile samples (lung tissue) were homogenized, titrated and plated onto 5% horse blood agar; then after 18–20 growth hours we counted the number of colonies and recalculated its number for one mouse. *Results.* Our investigations have shown that the complex preparation provided 90–100% animals' defence from used in this experiment infectious agent strains. Mice immunization with the preparation induced significant increase in the level of antibodies, revealed by means of indirect ELISA. Beginning with the third day after intranasal inoculation there was a pathogen multiplica-

tion in control group mice lungs. In the same time immunized mice had almost undetectable number of bacteria. Almost all animals from control group contained pathogen in lymph nodes and mesentery; though pathogen's presence in immune mice viscera was rather occasional. *Conclusion.* The complex preparation protected animals from all *H. influenzae* strains, used in our experiment. The dynamic of the infectious process directly depended on the development of immune response on the complex preparation injection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 111–115

Key words: *Haemophilus influenzae* infections, complex preparation, cross-protective activity, encapsulated and non-encapsulated strains

ВВЕДЕНИЕ

Фактические данные, накопленные в последние годы, свидетельствуют о том, что инфекции, вызываемые *H. influenzae*, имеют широкое распространение на территории России и являются актуальной проблемой здравоохранения [4]. Для профилактики инфекций, вызываемых капсульными штаммами (Hib), применяется конъюгированная вакцина Акт-ХИБ (Авентис Пастер, Франция). Для профилактики инфекций, вызываемых бескапсульными штаммами (NTHi), вакцины не существует. Между тем, распространенность, частота генерализации, тяжесть течения заболеваний и высокая летальность при инфекциях, обусловленных штаммами *H. influenzae*, принадлежащими к разным серотипам, требует разработки именно такой вакцины для специфической профилактики [8].

Описаны исследования, авторы которых химическим способом конъюгировали относительно консервативные детоксицированные липоолигосахариды с белками для формирования вакцин [7]. Эти конъюгаты были иммуногенны для мышей и кроликов и вызывали Т-зависимую иммунологическую защиту. Для создания нового вакцинного препарата, направленного на профилактику гемофильной инфекции, вызываемой как капсульными, так и бескапсульными штаммами *H. influenzae*, могут быть использованы липоолигосахариды, препараты, содержащие белки наружной мембраны, а также комбинация некоторых из них [5]. Основываясь на ранее проведенных исследованиях, в НИИВС им. И.И. Мечникова проведена НИР по разработке комплексного препарата, предназначенного для профилактики гемофильной инфекции. Целью настоящего исследования явилось изучение иммунобиологической активности разработанного препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы комплексный препарат, содержащий 1 мкг липоолигосахарида (ЛОС) и 10 мкг белоксодержащей фракции (БСФ), а также монопрепараты ЛОС, БСФ и препарат капсульного полисахарида (КПС). Препарат ЛОС получали экстракцией раствором хлорида натрия [1]. По данным субтипирования ЛОС принадлежит к наиболее распространенному бескапсульному штамму (№45 NTHi). Белоксодержащую фракцию получали методом водной экстракции (БСФ-ВЭ) [3]. Метод экстракции дополняли этапом очистки от нуклеиновых кислот с последующим диализом и очисткой от низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией. Капсульный полисахарид *H. influenzae* получали из культуральной жидкости экстракцией цетавлоном. Все препараты получены из микробных культур штаммов-продуцентов *H. influenzae* в лаборатории иммунохимической диагностики НИИВС им. И.И. Мечникова. Монопрепараты использовали как препараты сравнения.

Для изучения протективной активности комплексного препарата аутобредным мышам массой 14–16 г вводили однократно внутримышечно 0,5 мл (доза) препарата. Через 10 дней животных заражали живыми культурами *H. influenzae* капсульного (№1095) и бескапсульных штаммов (№45, №58, №65) в дозе 5×10^9 микр.кл./мышь. Наблюдение за животными проводили в течение 7 дней, регистрируя смертность.

Уровень специфических антител у иммунизированных животных выявляли в непрямом варианте ИФА. В качестве отрицательного контроля использовали сыровотки интактных животных.

Для изучения влияния комплексного препарата на развитие инфекционного процесса иммунизированных мышей интраназально заражали культурами капсульного и бескапсульного штаммов *H.influenzae* [6]. Контрольной группе вводили физиологический раствор. Вскрытие животных проводили через 3, 24, 48 и 72 часа. Стерильно отобранный материал (ткань легкого) гомогенизировали, титровали и мерно высевали на чашки Петри с сердечно-мозговым агаром с добавлением 5% крови и через 18-20 часов культивирования в термостате при температуре 36,5 °С и 5% CO₂ производили подсчет выросших колоний бактерий, после чего пересчитывали число бактерий на мышь.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что комплексный препарат обеспечивал защиту 90-100% животных от штаммов возбудителя, использованных в опыте. ЛОС NTHi 45 также обладал достаточно высокой перекрестной протективной активностью и в дозе 1 мкг защищал от заражения капсульным и бескапсульными штаммами (табл. 1). Добавление ЛОС к КПС стимулировало аналогичный уровень защиты (80-100%), в то время как введение мышам КПС создавало защиту только к капсульному H1b штамму. Белковый монокомпонент в дозе 10 мкг обладал меньшим протективным эффектом и защищал 50-60% мышей. Неожиданным обстоятельством явилось торможение протективных свойств варианта препарата, состоящего из белкового компонента и КПС H1b. Его протективная активность в отношении штамма H1b снижалась до 20-40%. В отношении бескапсульных штаммов этот эффект был менее выраженным, но тоже достоверным ($p < 0,05$).

Иммунизация мышей комплексным препаратом приводила к значимому увеличению уровня специфических антител, выявляемых в непрямом варианте ИФА (табл. 2). При иммунизации животных препаратами сравнения увеличение титров специфических антител зависело от использованного препарата. Высокий уровень IgG к ЛОС наблюдался при иммунизации ЛОС и исходной фракцией БСФ-ВЭ, что свидетельствовало о присутствии в последнем примеси липоолигосахарида. Иммунизация мышей БСФ-ВЭ приводила к образованию высокого уровня антител

Таблица 1. Протективная активность комплексного препарата

№ гр.	Препарат	Доза (мкг/мышь)	% выживших животных при заражении:			
			H1b 1095	NTHi 45	NTHi 58	NTHi 65
1	Комплексный препарат	10,0+1,0	90,0	100,0	100,0	100,0
2	ЛОС 45 NTHi	1,0	60,0	100,0	100,0	100,0
3	БСФ-ВЭ-45-3	10,0	60,0	60,0	50,0	60,0
4	КПС H1b	10,0	100,0	0	0	0
5	КПС+ЛОС	10,0+1,0	100,0	80,0	80,0	80,0
6	БСФ-ВЭ-45 3+КПС	10,0+10,0	20,0	40,0	30,0	30,0

Таблица 2. Уровень IgG к антигенам *H.influenzae* после иммунизации мышей комплексным препаратом и препаратами сравнения

№гр.	Препарат	Доза (мкг/мышь)	ОП 1:100 ИФА с иммуносорбентом		
			КПС H1b	ЛОС 45	БСП-ВЭ-45
1	Комплексный препарат	10,0+1,0	0,34	2,60	2,26
2	ЛОС 45 NTHi	1,0	0,26	1,94	1,18
3	БСФ-ВЭ	10,0	0,34	2,11	2,39
4	КПС H1b	10,0	0,35	0,24	0,13
5	КПС+ЛОС	10,0+1,0	0,34	1,81	1,32
6	БСФ-ВЭ+КПС	10,0+10,0	0,33	1,63	2,18
7	Инт.акт.мыши	-	0,30	0,33	0,31
8	Фон (б/сыв)	-	0,10	0,11	0,18

к ЛОС и БСФ-ВЭ. При этом уровень IgG к препарату БСФ был самым высоким. Высоким был уровень IgG к ЛОС при иммунизации животных смесью БСФ и ЛОС (ОП=2,6).

Развитие инфекционного процесса, контролируемого по высевам бактерий из внутренних органов животных, протекало по-разному в контрольной и опытных группах (рис. 1, 2). В контрольной группе, начиная с третьих суток, наблюдалось размножение возбудителя в легких. При этом у иммунизированных мышей количество бактерий, высеваемых из ткани легких, было незначительным в те же сроки наблюдения. Параллельно с высевами из легких, бактерии высевали из других органов (сердце, селезенка, печень, почки, лимфатические узлы брыжейки) Индекс обсемененности уже через три часа после заражения достигал единицы. Спустя 72 часа после заражения культурой штамма Hib 1095 обсемененность органов в опытных группах мышей резко снижалась, по сравнению с контролем; при заражении штаммом NTHi 45 возбудитель у опытных мышей не высевался. Через 144 часа наблюдения в органах мышей вновь обнаружен возбудитель в половине проб. Индекс обсемененности находился в пределах от 0,3 до 0,4. Практически у всех мышей контрольной группы возбудитель выделялся из лимфатических узлов, брыжейки, у иммунных мышей этот показатель был значимо ниже.

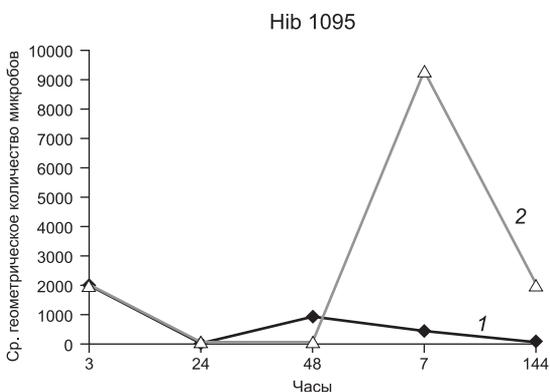


Рис. 1. Зависимость количества микробов в легких от времени наблюдения при заражении капсульным штаммом 1095.

1 — препарат, 2 — контроль.

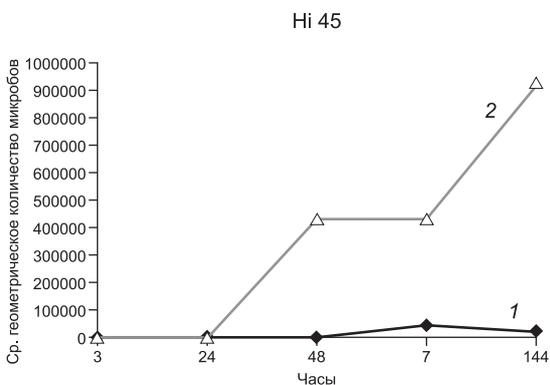


Рис. 2. Зависимость количества микробов в легких от времени наблюдения при заражении бескапсульным штаммом №45.

1 — препарат, 2 — контроль.

Инфекции, вызываемые *H. influenzae*, являются важной причиной заболеваемости и смертности в экономически развитых и развивающихся странах, прежде всего, среди детей раннего возраста. Учитывая распространенность и тяжелое течение инфекций, вызываемых наиболее вирулентным капсульным серотипом — Hib, нельзя недооценивать медико-социальную значимость заболеваний, вызываемых бескапсульными штаммами гемофильной палочки. Основными факторами патогенности таких штаммов являются белки наружной мембраны и ЛПС. Следует отметить, что штаммы не содержат полноценного липополисахарида, а содержат липоолигосахарид (ЛОС), лишенный длинных S-специфических цепей. При этом липоолигосахарид имеет уникальную структуру, и среди бескапсульных штаммов обнаружено более 10 различающихся по специфичности липоолигосахаридов. Поэтому сахарид-производные препараты для профилактики гемофильной инфекции должны содержать множество углеводных структур, чтобы обеспечить адекватный охват штаммов, вызывающих инфекции. Вакцина, направленная на поверхностно-представленные ЛОС, может быть возможным кандидатом для контроля NTHi инфекций. Однако детоксицированный ЛОС является T-независимой молекулой, слабо иммуногенной *in vivo*. Вдобавок к слабой иммуногенности ЛОС гетерогенность олигосахаридов и гомология между углеводными структурами на по-

верхности бактериальных клеток и клеточных мембранах макроорганизма делает разработку NTHi-вакцин нелегким заданием. За рубежом разрабатываются вакцинные препараты на основе видовых белков наружной мембраны (БНМ) и ЛОС. Все разрабатываемые препараты относятся к типу конъюгированных вакцин, обладающих свойствами Т-зависимого антигена. На основании данных субтипирования нами выбран наиболее распространенный в популяции бескапсульный штамм *H.influenzae* — №45 NTHi [2]. ЛОС 45NTHi обладал наиболее выраженной специфической и перекрестной активностью. Кроме того, методом водной экстракции нами получены белоксодержащие фракции (БСФ). Его производный — БСФ-ВЭ-3 хроматографически очищенный препарат обладал перекрестной серологической активностью, содержал в своем составе известные протективные белки наружной мембраны *H.influenzae* (P_2 , P_5 , P_6) и обладал низкой токсичностью ($LD_{50} \sim 2,0$ мкг). Препарат ЛОС защищал мышей от заражения летальными дозами гетерологичных бескапсульных штаммов. Добавление ЛОС к КПС стимулировало защиту (80-100%) от заражения капсульным и бескапсульными штаммами, в то время как введение мышам КПС создавало защиту только к капсульному Nib штамму. БСФ-ВЭ в дозе 10 мкг обладал протективным эффектом, защищая 50-60% мышей от заражения капсульным и бескапсульными штаммами *H.influenzae*. Изучение гуморального ответа на введение комплексного препарата и препаратов сравнения позволило прийти к заключению о том, что КПС Nib не стимулирует специфический иммунитет. Отсутствие антителиобразования может свидетельствовать о необходимости замены вида экспериментальной модели. Кроме того, КПС Nib не стимулирует специфический иммунитет к гетерологичным штаммам NTHi. Иммунизация мышей ЛОС приводила к значимому ($p < 0,05$) увеличению уровня антител. Добавление ЛОС к КПС не усиливало антителиобразование к КПС. Добавление к БСФ 1 мкг ЛОС усиливало перекрестную протективность обоих препаратов (80-100% мышей выживало). Высокий уровень IgG к ЛОС при иммунизации животных смесью БСФ и ЛОС ($OP=2,6$) указывает на стимуляцию гуморального иммунного ответа ЛОС и делает этот антиген значимым в составе комплексного вакцинного препарата, предназначенного для профилактики инфекций, вызываемых капсульными и бескапсульными штаммами гемофильной палочки.

Развитие инфекционного процесса изучали на легочной модели заражения [6], так как по нашему мнению, она разработана с учетом органотропности *H.influenzae* к тканям дыхательных путей и легких. После заражения иммунизированных комплексным препаратом животных формирования инфекционного процесса напрямую зависело от развития иммунного ответа на введение комплексного препарата. Таким образом, препарат, содержащий 10 мкг БСФ и 1 мкг ЛОС, обладал перекрестной протективной активностью, защищая 80-100 мышей от заражения летальными дозами капсульным и бескапсульными штаммами *H.influenzae*. Иммунизация мышей приводила к повышению уровня антител и к ЛОС, и к БСФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. Киев, Наукова думка, 2006.
2. Головинская О.В. Иммунобиологические свойства различных углеводсодержащих препаратов *Haemophilus influenzae*. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 2011.
3. Ефремова В.Е., Егорова Н.Б. Токсичность и протективная активность комплексного антигена стафилококка, полученного методом водной экстракции. Журн. микробиол. 1978, 12:59-63.
4. Онищенко Г.Г. Заболеваемость инфекциями, управляемыми средствами специфической профилактики, в Российской Федерации и задачи по их снижению и ликвидации. Журн. микробиол. 2003, 2:16-28.
5. Овечко Н.Н., Ястребова Н.Е. Антигены поверхностных структур *Haemophilus influenzae* как перспективные кандидат-вакцины, Журн. микробиол. 2017, 4:82-90.
6. Hoover J.L., Lewandowski T.F., Mininger C.L. et al. A robust pneumonia model in immunocompetent rodents to evaluate antibacterial efficacy against *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* or *A. baumannii*. J. Visualized Experiments. 2017, 119, e55068, doi:10.3791/55068.
7. Murphy T.F. Vaccines for nontypeable *Haemophilus influenzae*: the Future Is Now. Clin. Vaccine Immunol. 2015, May; 22(5): 459-466.
8. Sunakawa K., Takeuchi Y., Iwata S. Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) epidemiology. Kansenshogaku Zasshi. 2011, May;85(3) : 227-237.