

Махмудова Н.Р.¹, Ленёва И.А.¹, Ларионова Н.В.², Поддубиков А.В.¹,
Фалынскова И.Н.¹, Карташова Н.П.¹, Свитич О.А.¹

БЕЗОПАСНОСТЬ АТТЕНУИРОВАННОЙ И РЕКОМБИНАНТНОЙ ИНТРАНАЗАЛЬНЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ВТОРИЧНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СУПЕРИНФЕКЦИИ

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,
105064, г. Москва, Россия;

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, г. Санкт-Петербург, Россия

Введение. Грипп – тяжёлое вирусное заболевание. Наиболее частым постгриппозным осложнением являются пневмонии. Ранее авторами разработана экспериментальная мышиная модель вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа и *Staphylococcus aureus*. В ней был выявлен летальный синергизм между патогенами, отмечаемый в эпидемиологических наблюдениях.

Цель настоящего исследования – изучение эффекта введения интраназальных вакцин с последующим заражением *Streptococcus pneumoniae* на развитие и исход заболевания.

Материалы и методы. Животные были иммунизированы интраназально штаммом аттенуированной холодоадаптированной живой гриппозной вакцины A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 и рекомбинантной вакциной на основе вирусоподобных частиц (ВПЧ) HA(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag. Животные экспериментальных групп были инфицированы вирулентными штаммами вируса гриппа A/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 или A/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1). На 5-е сутки после интраназальной иммунизации животных подвергали бактериальному заражению штаммом *St. pneumoniae*. Синергизм вакцинного или вирусного агента с бактериальной инфекцией оценивали по выживаемости и снижению массы тела животных, титру вируса и плотности бактерий в носоглоточных смывах и лёгких.

Результаты. Иммунизация вакцинными препаратами не способствовала повышению чувствительности мышей к бактериальному заражению. Элиминация бактерий из лёгких и носоглотки в группах мышей, иммунизированных вакцинными препаратами, соответствовала динамике в группе животных, иммунизированных фосфатно-солевым буфером.

Обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют о безопасности интраназальной иммунизации препаратами холодоадаптированного аттенуированного штамма вируса гриппа A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 и ВПЧ, несущих HA(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag вируса гриппа, с точки зрения усиления вторичной бактериальной суперинфекции, вызванной *St. pneumoniae*.

Заключение. Исследованные вакцинные препараты успешно блокировали инфекции в нижних отделах респираторного тракта.

Ключевые слова: вирус гриппа; живая гриппозная вакцина; вирусоподобные частицы; вторичные бактериальные пневмонии после гриппозной инфекции.

Для цитирования: Махмудова Н.Р., Ленёва И.А., Ларионова Н.В., Поддубиков А.В., Фалынскова И.Н., Карташова Н.П., Свитич О.А. Безопасность аттенуированной и рекомбинантной интраназальных гриппозных вакцин в условиях развития вторичной бактериальной суперинфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6): 30-39.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-30-39>

Makhmudova N.R.¹, Leneva I.A.¹, Larionova N.V.², Poddubikov A.V.¹,
Falynskova I.N.¹, Kartashova N.P.¹, Svitich O.A.¹

THE SAFETY OF ATTENUATED AND RECOMBINANT NASAL INFLUENZA VACCINES IN TERMS OF THE DEVELOPMENT OF SECONDARY BACTERIAL SUPERINFECTION

¹I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Moscow, 105064, Russia;

²Federal State Budgetary Research Institution «Institute of Experimental Medicine», Saint-Petersburg, 197376, Russia

Introduction. Influenza is a severe viral disease. The most common post-influenza complication is pneumonia. Earlier, we developed an experimental mouse model of viral-bacterial pneumonia induced by successive infection with influenza virus and *St. aureus*, in which lethal synergy between pathogens observed in epidemiological observations was detected.

Aim. To study the effect of the administration of intranasal vaccines, followed by infection with *St. pneumoniae* on the development and completion of the disease.

Materials and methods. The animals were immunized intranasal with a strain of attenuated cold-adapted live influenza vaccine A/17/California/2009/38 (H1N1)pdm09 (LAIV) and a recombinant vaccine based on virus-like particles HA(Puerto Rico/8/34)-Gag (VLPs). Control groups of animals were infected with virulent strains of influenza virus A/ California/04/2009 (H1N1)pdm09 or A/Puerto Rico /8/34 (H1N1). On the fifth day after intranasal immunization with the vaccine preparations and infection with pathogenic strains, animals were subjected to bacterial infection with a strain of *St. pneumoniae*. The presence of synergism of vaccine or viral agent with bacterial infection was assessed by survival and weight loss of animals, virus titer and density of bacteria in nasopharyngeal washes and lungs.

Results. It was shown that immunization with vaccine preparations did not lead to increased sensitivity of mice to bacterial infection. Elimination of bacteria from the lungs and nasopharynx in groups immunized with vaccine preparations corresponded to the dynamics in the group of animals immunized by PBS.

Discussion. The results obtained indicate the safety of intranasal immunization with LAIV A/17/California/2009/38 (H1N1)pdm09 and virus-like particles HA (Puerto Rico/8/34)-Gag (VLPs) in terms of enhancing secondary bacterial superinfection caused by *St. pneumoniae*.

Conclusion. The studied vaccines successfully blocked infections in the lower respiratory tract.

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

For citation: Makhmudova N.R., Leneva I.A., Larionova N.V., Poddubikov A.V., Falynskova I.N., Kartashova N.P., Svitich O.A. The safety of attenuated and recombinant nasal influenza vaccines in terms of the development of secondary bacterial superinfection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6):30-39. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-30-39>

For correspondence: Nailya R. Makhmudova, PhD. Leading Researcher of Laboratory of Experimental Virology I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Moscow, 105064, Russia. E-mail: makhmudova_nr@mail.ru

Information about authors:

Makhmudova N.R., <https://orcid.org/0000-0003-2614-5091>

Leneva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Larionova N.V., <https://orcid.org/0000-0003-1171-3383>

Poddubikov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Falynskova I.N., <https://orcid.org/0000-0001-9836-9620>

Kartashova N.P., <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>

Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Acknowledgments. This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant No. 18-45-05002 Virus-like particles for the control of post-influenza bacterial infections, 2018-2020)

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 01 August 2019

Accepted 24 September 2019

Введение

Грипп – тяжёлое острое вирусное заболевание, которым ежегодно в мире болеют около 1 млрд человек, при этом 300–500 тыс. умирают от гриппа или от его осложнений. Наиболее частым постгриппозным осложнением является пневмония. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире регистрируется 429 млн случаев пневмонии, из них 300 млн – это пневмонии, перенесённые после тяжёлых случаев гриппа и острой респираторной вирусной инфекции [1].

Основным средством борьбы с гриппозной инфекцией является вакцинация. Несмотря на то что эффективность вакцинации традиционно оценивается по прямому действию – способности предотвращать заболеваемость гриппом, снижение числа осложнений, в частности пневмоний, несомненно, также относится к её достоинствам.

В последние годы всё более широкое распространение в мире получают живые аттенуированные гриппозные вакцины (ЖГВ), которые обеспечивают полноценную защиту, имитируя инфекцию эпидемическим вирусом и стимулируя те же звенья иммунного ответа, что и патогенный вирус. Несмотря на то что современные ЖГВ имеют ряд неоспоримых достоинств (эффективность, безопасность, перекрёстный защитный эффект против дрейфовых вариантов возбудителей гриппа, назальное введение) [2, 3], их применение до сих пор дискутируется. Сомнения вызывает, в частности, факт, что гриппозная инфекция инициирует увеличение количества бактерий *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* в назофарингеальном тракте животных и человека, повышая риск инфицирования бактериальными патогенами верхнего и нижнего отделов респираторного тракта с дальнейшим развитием заболевания [4, 5]. Это вызывает вопрос о потенциальной опасности, поскольку интраназальная иммунизация ЖГВ также может приводить к увеличению плотности бактерий в назофарингеальном тракте с последующей трансмиссией в лёгкие [6]. Одним из инновационных подходов является использование вирусоподобных частиц (ВПЧ). Они представляют собой копию оболочки вируса в отсутствие генетического материала и используются как платформа для разработки противогриппозных вакцин, некоторые из них уже находятся на стадии клинических испытаний [7]. Такие вакцины благодаря скорости изготовления должны решить давнюю проблему своевременного появления вакцин против быстро мутирующего вируса гриппа. В частности, мы изучаем ВПЧ, полученные в клетках насекомых с помощью бакуловирусных векторов, несущие НА вируса гриппа – поверхностный белок, который играет значительную роль в адгезии вируса к клеткам респираторного эпителия назофарингеального тракта.

Ранее нами разработана экспериментальная мышьяная модель вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа и *St. aureus*, в которой был выявлен летальный синергизм между патогенами, отмечаемый в эпидемиологических наблюдениях [8].

Цель настоящей работы – изучение эффекта интраназальных вакцин холодоадаптированного аттенуированного штамма вируса гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) pdm09 и ВПЧ, несущих НА вируса гриппа, с последующим заражением *St. pneumoniae* на развитие пневмонии и исход заболевания.

Материалы и методы

Штамм живой гриппозной вакцины, вирусоподобные частицы и патогены. Для вакцинации животных использовали аттенуированный штамм ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) pdm09, предоставленный отделом вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург, Россия).

Штамм ЖГВ был получен путём классической реассортации вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1) pdm09 – возбудителя пандемии 2009 г. – и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). В вакцинном реассортанте присутствуют гены, кодирующие внутренние белки вириона PB2, PB1, PA, NP, M и NS от донора аттенуации, и гены НА и NA, ответственные за антигенную актуальность, от пандемического вируса [3]. Лиофилизированный штамм ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) pdm09 восстанавливали, добавляя 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), и определяя

ли его инфекционную активность титрованием в 9-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Далее аттенуированный штамм ЖГВ накапливали в РКЭ при 32–33 °С в течение 72 ч и использовали для иммунизации мышей.

Также для вакцинации был использован препарат, полученный с помощью конструирования бакуловирусного вектора, экспрессирующего ВПЧ при заражении клеток насекомых. ВПЧ, образованные комбинаций ретровирусного Gag белка и НА вируса гриппа, происходящего от штамма А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), были наработаны в виде неочищенного препарата (НА-Gag ВПЧ), содержащего инфекционный бакуловирусный вектор. ВПЧ были получены и охарактеризованы М. Klausberger (Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna) в рамках совместного гранта Российского научного фонда.

Для заражения животных использовали вирус гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), полученный из музея ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, и адаптированный к мышам пандемический вирус гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09. Для адаптации вируса мышам заражали интраназально аллантаическим вирусом, после проявления признаков заболевания в стерильных условиях получали лёгочный гомогенат, который использовали для заражения 9-дневных РКЭ. Вирусы для заражения выращивали в 9-дневных РКЭ в течение 72 ч при 37 °С [9]. После определения инфекционной активности вирусов, выраженной в lg ЭИД₅₀/мл, их использовали для инфицирования животных.

Для бактериального заражения использовали штамм *St. pneumoniae* № 3405 из коллекции микроорганизмов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия).

Лёгочную суспензию разводили ФСБ, далее осуществляли посев на чашки Петри с плотной средой «Питательный агар» (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk, Россия) с добавлением 5% лошадиной крови. Культуру инкубировали при 37 °С в 5,5% CO₂ среде в течение 18–24 ч.

Животные. Мыши линии BALB/c массой тела 12–14 г получены из питомника ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, филиал «Андреевка» (Московская область).

Определение эффекта вакцинации в модели бактериальной пневмонии. Животных вакцинировали интраназально штаммом ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 в дозе 6 lg ЭИД₅₀/50 мкл, или ВПЧ в дозе 1,25 мкг НА/мышь. Через 5 сут проводили интраназально бактериальное заражение штаммом *St. pneumoniae* в дозе 1,25 · 10⁷ колониеобразующих единиц (КОЕ/мл).

Животных 1-й группы (n=30) инфицировали интраназально адаптированным патогенным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 дозой 10⁵ ТЦИД₅₀ с последующим бактериальным заражением. Животных 2-й группы (n=30) инфицировали интраназально вирусом гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34(H1N1) в дозе 10² ТЦИД₅₀ с последующим бактериальным заражением. Животным 3-й группы (n=30) вводили интраназально стерильный ФСБ и через 5 сут их заражали интраназально *St. pneumoniae* в дозе 1,25 · 10⁷ КОЕ/мл.

Патогенез бактериальной пневмонии после инфекции вирусами гриппа оценивали по выживаемости животных, средней продолжительности их жизни, а также по снижению массы тела.

Среднюю продолжительность жизни животных высчитывали по формуле:

$$MSD = \sum f(d-1)/n,$$

где *f* – количество мышей, умерших на день *d*, *n* – количество мышей в группе. Массу тела животных оценивали ежедневно. Её изменение рассчитывали отдельно для каждой мыши и выражали в процентах, при этом за 100% принимали массу тела животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определяли среднее значение снижения или увеличения массы тела (в процентах).

Изучение биологического материала животных. Животные были размещены и обработаны в соответствии с законодательством Европейского Союза и с Международ-

ными руководящими принципами этического обращения с лабораторными животными [10]. Использование протокола гуманного обращения с животными было одобрено локальным комитетом по биоэтике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия).

В каждой группе умерщвляли мышей до и после бактериального заражения для определения титра вируса. На 3-и и 5-е сутки после бактериального заражения животных умерщвляли для определения обсеменённости лёгких и носоглоточных смывов. В указанные дни в каждой группе умерщвляли по 3 мыши, в стерильных условиях извлекали лёгкие, гомогенизировали их и ресуспендировали в 1 мл холодного стерильного 0,01M ФСБ. Суспензию осветляли от клеточного дебриса центрифугированием при 2000g в течение 10 мин, 0,1 мл супернатанта отбирали для определения бактериальной плотности, а оставшийся супернатант использовали для определения инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK. Полученные образцы хранили при 4 °C не более 1 нед до постановки экспериментов.

Определение инфекционного титра вируса в лёгких мышей. Клетки MDCK рассаживали в 96-луночных планшетах фирмы Costar (США) со средней плотностью 30 000–35 000 клеток на лунку и выращивали в минимальной среде Игла (MEM) в присутствии 5% сыворотки телят, 10 mM глутамин и антибиотиков (пенициллин 100 ME/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) до полного монослоя. Готовили 10-кратные разведения каждой пробы вируса из лёгких (цельный до 10^8) на среде с добавлением ТРСК-трипсина (2 мкг/мл). Полученными разведениями заражали монослой четырех лунок 96-луночного планшета. После инкубации при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 72 ч клетки трижды промывали ФСБ и фиксировали 10% раствором формальдегида при 18–23 °C в течение 5 мин. После удаления раствора формальдегида в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл 1% раствора кристаллического фиолетового и выдерживали при 18–23 °C в течение 5 мин. После промывки водой и высушивания планшета в лунку добавляли по 0,1 мл 96% спирта, инкубировали при покачивании (комнатная температура в течение 20 мин), а затем измеряли оптическую плотность при длине волны 570 нм. Лунки считали «положительными», если оптическая плотность была ниже таковой в клеточном контроле на 20%.

Определение обсеменённости респираторных путей. Для определения плотности бактерий *St. pneumoniae* образцы гомогенизированных лёгких или носоглоточные смывы разводили ФСБ, диапазон разведений определяли опытным путем. Осуществляли посев соответствующих разведений на чашки Петри с плотной средой «Питательный агар» (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Россия) с добавлением 5% лошадиной крови. Культуру инкубировали при 37 °C в 5,5% CO₂ среде в течение 18–24 ч. Чистоту выросшей культуры определяли визуально и микроскопически в мазках, окрашенных по Грамму.

Идентичность подтверждали фенотипически, тинкториально, по наличию α-гемолиза, в тестах с оптохином и желчью, а также в реакции латекс-агглютинации с соответствующими серотиповыми сыворотками (Statens Serum Inst., Дания).

Обсеменённость лёгочной ткани рассчитывали, умножая число выросших колоний на степень разведения и коэффициент, обратный объёму посеянного материала, и выражали в Ig КОЕ/мл.

Все манипуляции с патогенными материалами проводили в МСК класса АИИ на объекте БСЛ-2.

Статистическая обработка данных. Полученные цифровые данные были подвергнуты статистической обработке в программе Statistica 8.0. Выживаемость в группах мышей сравнивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программе Statistica 8.0. Для сравнения изменений массы тела мышей использовали однофакторный дисперсионный анализ для нелинейных моделей, четырёхпараметрическую log-логистическую модель. Анализ выполнен в приложении R-Studio (Version 1.0.136).

Результаты

Динамика массы тела и летальность у мышей после иммунизации и последующего бактериального заражения. Основной целью работы было изучение влияния интраназальной иммунизации мышей вакцинными препаратами ЖГВ и рекомбинантной вакцины на основе ВПЧ на развитие вторичной бактериальной инфекции при заражении сублетальной дозой *St. pneumoniae*. Группы положительного контроля были сформированы путём инфицирования мышей низкими дозами патогенных вирусов гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 или А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) с последующим заражением *St. pneumoniae* на 5-е сутки после инфекции вирусами гриппа, что приводило к развитию известного эффекта вирусно-бактериального синергизма. Наблюдалось прогрессирующее снижение массы тела животных на протяжении всего эксперимента, заканчивающееся 100% летальностью (рис. 1, рис. 2). В то же время животные, иммунизированные холодоадаптированным вакцинным вирусом гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 или препаратом НА(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag ВПЧ, не демонстрировали признаков заболевания после бактериального заражения, летальности не наблюдалось. Динамика показателей выживаемости в течение эксперимента (см. рис. 1), а также изменения массы тела экспериментальных животных соответствовали показателям группы животных, иммунизированных ФСБ (см. рис. 2). Таким образом, продемонстрировано отсутствие негативного влияния иммунизации ЖГВ и НА(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag ВПЧ на развитие вторичной бактериальной инфекции.

Титр вируса в лёгких мышей экспериментальных групп исследовали 2 раза: до и после бактериального заражения *St. pneumoniae*. В образцах, полученных от животных, вакцинированных холодоадаптированным штаммом ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09, выделения вируса из лёгких мышей не наблюдали, что закономерно подтверждает аттенуированный фенотип вакцинного штамма. А в группах животных, заражённых патогенным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 или вирусом гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), вирус выделялся из лёгких с титром $4,5 \pm 2,3$ и $3,5 \pm 0,5$ Ig ТЦИД₅₀/мл до бактериального заражения, $6,2 \pm 2,3$ и $7,5 \pm 1,5$ Ig ТЦИД₅₀/мл после бактериального заражения соответственно (см. таблицу). Таким образом, бактериальное заражение провоцировало размножение патогенных вирусов, но не сказывалось на репродукции аттенуированного штамма ЖГВ.

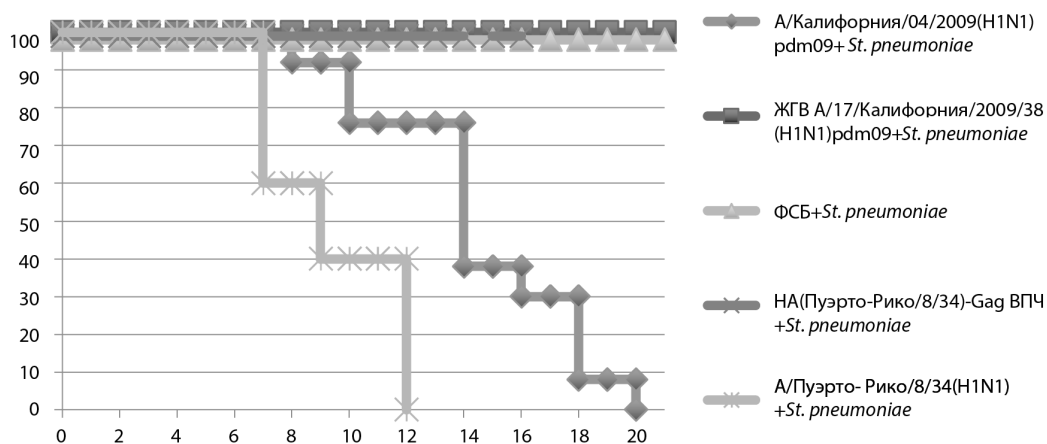


Рис. 1. Выживаемость мышей после заражения *St. pneumoniae* при изучении эффекта вакцинации живой гриппозной вакциной А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 и препаратом НА(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag ВПЧ.

ЖГВ – живая гриппозная вакцина; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; НА – гемагглютинин; ВПЧ – вирусоподобные частицы.

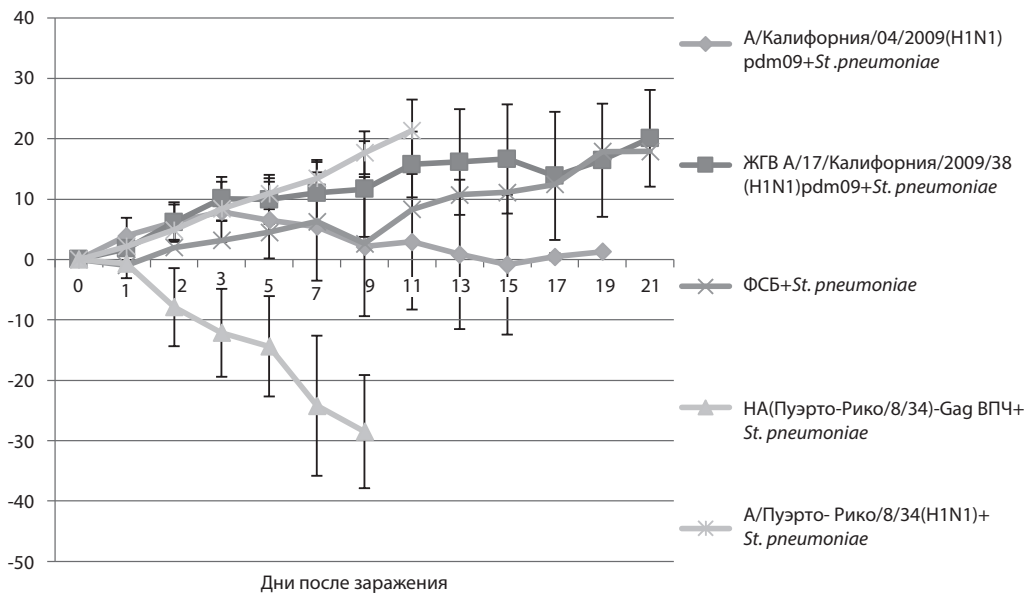


Рис. 2. Изменение массы тела мышей, инфицированных *St. pneumoniae*, при изучении эффекта вакцинации живой гриппозной вакциной А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 и препаратом HA(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag ВПЧ

ЖГВ – живая гриппозная вакцина; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; HA – гемагглютинин; ВПЧ – вирусоподобные частицы.

Бактериальная обсеменённость лёгких и носоглоточных смывов животных в экспериментальных группах. Сравнительное изучение продуктивности бактериального роста в группах мышей на 3-и сутки после бактериального заражения показало, что независимо от иммунизирующего агента, включая инфекцию патогенными штаммами, наблюдался высеv бактериальных колоний из образцов носоглоточных смывов в диапазоне от 3 до 5 log КОЕ₅₀/мл (см. таблицу). В группах, иммунизированных вакцинными препаратами, выявлена тенденция к снижению высева из носовых смывов по сравнению с группой контроля ФСБ и группами, получившими инфекцию вирулентными вирусами. Так, в группе мышей, иммунизированных штаммом ЖГВ, количество колоний составило 3,55 ± 0,19 log КОЕ/мл, а в группе, вакцинированной препаратом ВПЧ, – 3,0 ± 0,5 log КОЕ/мл. В группах мышей, заражённых патогенными вирусами А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 и А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), – 4,72 ± 0,08 и 5,75 ± 0,05 log КОЕ/мл соответственно. На 5-е сутки после бактериального заражения материал носовых смывов и гомогенатов лёгких, полученный от групп животных, иммунизированных ЖГВ, ВПЧ или заражённых только *St. pneumoniae*, не имел признаков бактериального роста. При этом в образцах гомогенатов лёгких, полученных от групп животных, заражённых патогенными вирусами гриппа с последующим заражением *St. pneumoniae*, наблюдался рост числа колоний на 2–3 log КОЕ/мл по сравнению с показателями 3-х суток. Одновременно в этих группах на 5-е сутки наблюдалась элиминация *St. pneumoniae* из верхнего респираторного тракта (см. таблицу).

Обсуждение

Наличие вирусно-бактериального синергизма зависело от репродукционной активности вируса в лёгких мышей. При заражении вирусами гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 и А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) рост обсеменённости лёгких на 5-е сутки после бактериального заражения свидетельствует о смещении вирусного инфекционного процесса в нижние отделы респираторного тракта. А в группе мышей, приви-

Сравнение эффективности заражения / вакцинации на развитие осложнений в экспериментальной модели вторичной гриппозной пневмонии мышей, вызванной *St. pneumoniae*

Экспериментальные группы	Средняя продолжительность жизни, сут	Титр вируса в лёгких, lg ТЦИД ₅₀ /мл		Обсеменённость после бактериального заражения, lg КОЕ/мл			
		до заражения	после заражения	лёгкие		смывы	
				3-и сутки	5-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
А/Калифорния/04/2009 (H1N1) pdm09 + <i>St. pneumoniae</i>	14,5	4,5 ± 2,3	6,2 ± 2,3	4,62 ± 0,15	6,13 ± 0,16	4,72 ± 0,08	Н/о
ЖГВ А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) pdm09 + <i>St. pneumoniae</i>	> 21	Н/о	Н/о	4,38 ± 0,07	Н/о	3,55 ± 0,19	Н/о
А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) + <i>St. pneumoniae</i>	9,2	3,5 ± 0,5	7,5 ± 1,5	5,25 ± 0,25	8,0 ± 0,5	5,75 ± 0,5	Н/о
НА(Пуэрто-Рико/8/34)-Gag ВПЧ + <i>St. pneumoniae</i>	> 21	Н/о	Н/о	4,1 ± 0,02	Н/о	3,0 ± 0,5	Н/о
Контроль (ФСБ) + <i>St. pneumoniae</i>	> 21	Н/о	Н/о	4,46 ± 0,05	Н/о	4,23 ± 0,07	Н/о

Примечание. Н/о – не обнаружено; ЖГВ – живая гриппозная вакцина; ВПЧ – вирусоподобные частицы; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

тых аттенуированным вирусом ЖГВ, который из-за холодоадаптированного фенотипа не способен к репродукции в нижних отделах респираторного тракта, бактериальная пневмония не развивалась. Соответственно нереплицирующаяся вакцина на основе ВПЧ также не провоцировала бактериальный рост в лёгких.

Полученные результаты представляются неожиданными, поскольку известно, что штаммы холодоадаптированной ЖГВ могут обладать повышенной интерферогенностью при интраназальной вакцинации [11]. Кроме того, препараты ВПЧ за счёт присутствия компонентов бакуловirusа могут стимулировать продукцию интерферонов [9]. Известно, что выработка интерферонов 1-го типа при вирусной инфекции или вакцинации может стать одним из провоцирующих факторов вторичной бактериальной инфекции из-за их негативного влияния на активность фагоцитирующих клеток и приток нейтрофилов в очаг инфекции [12, 13]. В отличие от наших данных, M.J. Mina и соавт. [6] в исследованиях на мышах наблюдали 2–5-кратное увеличение обсеменённости бактериальной флорой верхнего респираторного тракта мышей, иммунизированных штаммом холодоадаптированной ЖГВ А(Н3N2), аналогично тому, как растёт плотность бактерий при инфицировании диким вирусом гриппа. Однако, несмотря на рост микрофлоры в верхних дыхательных путях, авторы сделали вывод о том, что ЖГВ, в отличие от диких вирусов гриппа, не приводят к заболеваниям нижних дыхательных путей. Многочисленные клинические и эпидемиологические исследования ЖГВ, а также применение ЖГВ в практике здравоохранения демонстрируют не только их высокую профилактическую эффективность, но и несомненную безвредность [14–17]. Низкая реактогенность ЖГВ против сезонных вирусов гриппа, а также вирусов гриппа с пандемическим потенциалом не только свидетельствует об отсутствии остаточной вирулентности в препаратах ЖГВ, но и показывает, что в ответ на введение ЖГВ не развивается осложнений в форме сопутствующих инфекций и соматических заболеваний. В отличие от ЖГВ, вакцины на основе ВПЧ находятся на ранней стадии своего развития и призваны прийти на смену разнообразным сезонным гриппозным вакцинам. Развитие технологии ВПЧ направлено на

создание нового поколения универсальных гриппозных вакцин. Аналогично ЖГВ, ставка делается на формирование мукозального иммунитета после интраназальной вакцинации ВПЧ, презентующими различные антигены вирусов гриппа [18, 19]. В этом аспекте представленное исследование позволяет сделать вывод, что препараты ВПЧ безопасны в отношении развития вторичной бактериальной инфекции, так же как и аттенуированные штаммы ЖГВ.

Заключение

В экспериментальной мышинной модели вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа и *St. pneumoniae*, изучен эффект интраназальных вакцин холодоадаптированного аттенуированного штамма вируса гриппа А/17/Калифорния/2009/38 (H1N1)pdm09 и ВПЧ, несущих НА вируса гриппа, на развитие и исход заболевания. Доказано, что вакцины блокировали инфекции в нижних отделах респираторного тракта.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4-7, 9-13, 15-19 см. REFERENCES)

2. Григорьева Е.П., Дринецкий В.П., Дорошенко Е.М., Дешева Ю.А., Ерофеева М.К., Максакова В.Л. и др. Эффективность живой гриппозной реассортантной вакцины при циркуляции дрейфовых вариантов вирусов гриппа. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2009; (1): 45-53.
3. Ларионова Н.В., Киселева И.В., Миронов А.Н., Бушменков Д.С., Донина С.А., Петухова Г.Д. и др. Живая гриппозная вакцина из реассортантного штамма А/17/ Калифорния/2009/38 (H1N1) – эффективный препарат для профилактики пандемического гриппа. *Медицинский академический журнал*. 2011; 11(4): 3-12.
8. Ленева И.А., Леонова Е.И., Махмудова Н.Р., Фалынскова И.Н., Федякина И.Т., Зверев В.В. и др. Разработка экспериментальной модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(5): 27-32.
14. Григорьева Е.П., Дорошенко Е.М., Руденко Л.Г. Современное состояние вакцинопрофилактики гриппа с помощью живой гриппозной вакцины. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2005; 4(23): 13-7.

REFERENCES

1. WHO. Initiative for Vaccine Research (IVR). Options for Live Attenuated Influenza Vaccines (LAIV) In the Control of Epidemic and Pandemic Influenza. Geneva; 2007.
2. Grigor'eva E.P., Drinevskiy V.P., Doroshenko E.M., Desheva Yu.A., Erofeeva M.K., Maksakova V.L., et al. Efficacy of a live influenza reassortant vaccine in circulating drift variants of influenza viruses. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2009; (1): 45-53. (in Russian)
3. Larionova N.V., Kiseleva I.V., Mironov A.N., Bushmenkov D.S., Donina S.A., Petukhova G.D., et al. Live influenza vaccine from the reassortant strain A/ 17/California/2009 / 38 (H1N1) is an effective drug for the prevention of pandemic influenza. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal*. 2011; 11(4): 3-12. (in Russian)
4. Nakamura S., Davis M., Weiser J.N. Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *J. Clin. Invest.* 2011; 121(9): 3657-65. Doi: <https://doi.org/10.1172/JCI57762>
5. Plotkowski M.C., Puchelle E., Beck G., Jacquot J., Hannoun C. Adherence of type I *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986; 134(5): 1040-4. Doi: <https://doi.org/10.1164/arrd.1986.134.5.1040>
6. Mina M.J., McCullers J.A., Klugman K.P. Live Attenuated influenza Vaccine Enhances Colonization of *Streptococcus pneumoniae* in Mice. *MBio*. 2014; 5(1): 01040-13. Doi: <https://doi.org/10.1128/mBio.01040-13>
7. Wong S.S., Webby R.J. Traditional and New Influenza Vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(3): 476-92. Doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-12>
8. Leneva I.A., Leonova E.I., Makhmudova N.R., Falynskova I.N., Fedyakina I.T., Zverev V.V., et al. Elaboration of an experimental model of combined viral and bacterial pneumonia. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(5): 27-32. (in Russian)
9. Margine I., Martinez-Gil L., Chou Y.Y., Krammer F. Residual baculovirus in insect cell-derived influenza virus-like particle preparations enhances immunogenicity. *PLoS One*. 2012; 7(12): 51559. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051559>
10. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

11. Rekestin A.R., Kiseleva I.V., Klimov A.I., Katz J.M., Rudenko L.G. Interferon and other proinflammatory cytokine responses in vitro following infection with wild-type and cold-adapted reassortant influenza viruses. *Vaccine*. 2006; 24(44-46): 6581-4. Doi: <https://10.1016/j.vaccine.2006.05.091>
12. Lee B., Robinson K.M., McHugh K.J., Scheller E.V., Mandalapu S., Chen C., et al. Influenza-induced type I interferon enhances susceptibility to gram-negative and gram-positive bacterial pneumonia in mice. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2015; 309(2): L158-67. Doi: <https://10.1152/ajplung.00338.2014>
13. Shahangian A., Chow E.K., Tian X., Kang J.R., Ghaffari A., Liu S.Y., et al. Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119(7): 1910-20. Doi: <https://10.1172/JCI35412>
14. Grigor'eva E.P., Doroshenko E.M., Rudenko L.G. Modern status of influenza vaccination with live influenza vaccine. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2005; 4(23): 13-7. (in Russian)
15. Carter N.J., Curran M.P. Live Attenuated Influenza Vaccine (FluMist®; Fluenz™). A review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults. *Drugs*. 2011; 71(12): 1591-622. Doi: <https://10.2165/11206860-000000000-00000>
16. Rudenko L.G., Slepshkin A.N., Monto A.S., Kendal A.P., Grigorieva E.P., Burtseva E.P., et al. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia. *J. Infect. Dis.* 1993; 168(4): 881-7. Doi: <https://10.1093/infdis/168.4.881>
17. Rudenko L.G., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Naykhin A., Donina S., et al. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind phase I study. *Vaccine*. 2015; 33(39): 5110-7. Doi: <https://10.1016/j.vaccine.2015.08.019>
18. Lee Y.T., Ko E.J., Lee Y., Kim K.H., Kim M.C., Lee Y.N., et al. Intranasal vaccination with M2e5x virus-like particles induces humoral and cellular immune responses conferring cross-protection against heterosubtypic influenza viruses. *PLoS One*. 2018; 13(1): 0190868. Doi: <https://10.1016/10.1371/journal.pone.0190868>
19. Schwartzman L.M., Cathcart A.L., Pujanauski L.M., Qi L., Kash J.C., Taubenberger J.K. An Intranasal Virus-Like Particle Vaccine Broadly Protects Mice from Multiple Subtypes of Influenza A Virus. *MBio*. 2015; 6(4): 01044. Doi: <https://10.1128/mBio.01044-15>

Поступила 01.08.19

Принята в печать 24.09.19