

УДК 66.047

ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕСКЛЕТОЧНЫХ КОКЛЮШНЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АНТИГЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОПЛЕНОЧНОЙ И ПЛАНКТОННОЙ КУЛЬТУР *BORDETELLA PERTUSSIS*

Е.М. Зайцев, М.В. Брицина, М.Н. Озерецковская, А.Е. Зайцев

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

Введение

Коклюш остается актуальной проблемой здравоохранения во всем мире, в том числе в странах с высоким уровнем вакцинации, где начиная с 1990-х годов отмечается рост заболеваемости коклюшем, увеличение тяжести течения заболевания и летальности [1–3]. Наряду с другими факторами, одной из вероятных причин продолжающейся циркуляции возбудителя коклюша может быть персистенция в респираторном тракте биопленок *B. pertussis*, отличающихся от планктонных клеток повышенной устойчивостью к иммунной системе хозяина и антибактериальным препаратам. Существующие бесклеточные вакцины против коклюша содержащие антигены, выделенные из планктонных культур *B. pertussis*, защищают привитых от коклюша, однако недостаточно эффективно влияют на циркуляцию вирулентных штаммов *B. pertussis* [4]. В связи с этим, перспективным направлением совершенствования вакцинопрофилактики коклюшной инфекцией является создание вакцин нового поколения на основе использования антигенов, выделенных из биопленочных культур *B. pertussis* [5].

Цель работы – изучение протективной активности обезвреженных коклюшных антигенных комплексов (БКВ), выделенных из биопленочной и планктонной культур *Bordetella pertussis*.

Материалы и методы

Штаммы *B. pertussis*: штамм № 317 (серовариант 1.2.3), выделенный в РФ от больного коклюшем в 2003 г. от 8-ми летнего больного ребенка, депонирован в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России 15.09.2017 г., патент № 2689903, может быть использован для производства бесклеточных коклюшных вакцин; нейротропный штамм № 18323.

Животные: Мыши-гибриды F₁ (СВАхС₅₇ Bl₆) массой 12–14 и 14–16 г., получены из питомника «Андреевка» Московской области.

Питательные среды: питательная среда для культивирования и выделения коклюшного микроба сухая («Бордетелагар»), ФБУН ГНЦПМБ г. Оболенск; жидкая синтетическая питательная среда (ЖСС), содержащая аминокислоты, соли и витамины. Планшеты плоскодонные 96-луночные полимерные для иммунологических реакций однократного применения «Linbro», США. Флаконы пластиковые культуральные, «SPL Life Sciences», Республика Корея, (площадь 175 см²). Чашки Петри пластиковые, диаметр 9 см, ПО «Ленмедполимер», РФ. Краситель Генциан-Виолет (0,1 %). Этанол 95 %. Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ).

Культивирование штаммов *B. pertussis*. Контроль морфологических, серологических и культуральных свойств штаммов *B. pertussis* проводили в соответствии с Методическими указаниями [6].

В ампулы с лиофилизированными культурами вносили стерильный физиологический раствор в объеме 0,5 мл. Полученную взвесь вносили пастеровской пипеткой в 2 пробирки со средой «Бордетелагар» взвесь равномерно распределяли по поверхности среды. Пробирки выдерживали в термостате при температуре (37,0±0,5) °С в течение 3 суток – 1 пассаж. Выросшие колонии переносили в 8 пробирок со средой «Бордетелагар» и выдерживали в термостате при температуре (37,0±0,5) °С 2 суток – 2-ой пассаж. Культуры с пробирок 2 пассажа смывали в 2 колбы с рабочим объемом 200 мл, заполненных жидкой синтетической питательной средой – 3 пассаж. Колбы переносили в шуттель-аппарат и культивировали при температуре (37,0±0,5) °С в течение 12 часов – 4 пассаж (маточная культура для посевов на культуральные флаконы). Культуру из колб пересевали в пластиковые культуральные флаконы с жидкой питательной средой. Расчетная посевная доза составляла 5,0–6,0 МОЕ/мл. Для получения биопленочных культур культуральные флаконы помещали в термостат с температурой (37,0±0,5) °С в горизонтальном положении (в стационарных условиях) и выдерживали в течение 5 суток.

Для получения планктонных культур культуральные флаконы помещали в шуттель-аппарат и шуттелировали в течение 5 суток при температурой $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. После выращивания отбирали пробы из каждого флакона и определяли концентрацию микробной массы. Концентрация микробной массы, выращенной при статическом культивировании и при шуттелировании составляла 50 млрд микробных клеток.

Интенсивность образования биопленок в культуральных флаконах оценивали окрашиванием 0,1 % раствором генциан-виолета по показателям оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя по отношению к негативному контролю ($\text{ОП}_\text{к} = 0,047$), как плотные ($\text{ОП} \geq 0,188$), умеренные ($0,094 \leq \text{ОП} < 0,188$), слабые ($0,070 \leq \text{ОП} < 0,094$), отсутствие биопленок ($0,047 < \text{ОП} < 0,070$) в соответствии с ранее описанным методом [7].

Получение БКВ из биопленочных и планктонных культур *B. pertussis*. БКВ из биопленочных и планктонных культур *B. pertussis* были изготовлены в соответствии с ранее описанным методом получения бесклеточной коклюшной вакцины [8]. Культуры, выращенные в культуральных флаконах центрифугировали при 12500 об/мин в течение 40 ± 5 минут при $t + 4^\circ\text{C}$. Надосадочную жидкость переливали в колбы и методом кислотного осаждения выделяли антигенные комплексы коклюшного микроба (с помощью гексаметофасфата натрия, серной, соляной и трихлоруксусной кислот) снижая pH до $3,4 \pm 0,05$ при постоянном перемешивании). Осадок отделяли центрифугированием при 12500 об/мин в течение 60 ± 5 минут при $t + 4^\circ\text{C}$, растворяли его в фосфатном буферном растворе pH $7,4 \pm 0,1$ с конечной pH $7,5 - 7,7$ и гомогенизировали на электрическом гомогенизаторе в течение 12 секунд. Определение концентрации белка в суспензии антигенных комплексов проводили по методу Лоури. Содержание белка в суспензии антигенного комплекса из биопленочной культуры составляло 990 мкг/мл, а из планктонной – 1470 мкг/мл. Обезвреживание (детоксикацию) антигенных комплексов *B. pertussis* проводили формалином до концентрации 0,4 % с добавлением сахарозы (10 %) в течение 20 суток при периодическом встряхивании при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Для иммунизации животных препараты сорбировали на геле гидроокиси алюминия в таком соотношении, чтобы в 1 мл смеси содержалось 50 мкг белка, 0,3 мг алюминия гидроксида и ФСБ до 1 мл.

Оценка гистаминсенсibiliзирующей активности. Контроль полноты детоксикации препаратов проводили методом определения гистаминсенсibiliзирующей активности. Мышей – самок линии F_1 (СВАхС₅₇ BL₆), весом 14–16 г., иммунизировали однократно двумя вариантами БКВ в дозах 12,5, 25,0 и 50,0 мкг. Через 12 дней иммунизированным мышам вводили гистамин дигидрохлорид в дозе 2 мг и учитывали гибель животных через 1 и 24 часа. Величину гистаминсенсibiliзирующей активности (ГСД_{50}) рассчитывали по формуле Кербера в модификации Ашмарина [9].

Оценка протективной активности БКВ. Протективные свойства БКВ оценивали в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [10] на модели развития менингоэнцефалита у мышей, зараженных нейротропной вирулентной культурой *B. pertussis* штамм 18323.

Испытуемыми препаратами («БКВ-Б» и «БКВ-П») иммунизировали 2 группы мышей линии F_1 (СВАхС₅₇ BL₆), весом 12–14 г. по 15 голов в каждой дозой 25 мкг на мыш. Контрольную группу составляли интактные мыши. Спустя 14 дней после иммунизации, мышей заражали интрацеребрально *B. pertussis* штамм 18323 в дозе 100000 микробных клеток и наблюдали за ними в течение 14 суток, ежедневно регистрируя число выживших животных. Опыт сопровождали контролем ЛД₅₀ вирулентной коклюшной культуры.

Изучение персистенции микробных клеток в легких мышей при интраназальном заражении вирулентным штаммом. Двум группам мышей гибридов F_1 (СВАхС₅₇ BL₆), весом 12–14 г., однократно внутрибрюшинно вводили БКВ-Б и БКВ-П в дозе 25 мкг. Контрольную группу составили интактные мыши. На 14 сутки после иммунизации мышей опытных и контрольной группы заражали интраназально нейротропной вирулентной культурой *B. pertussis* штамм 18323 в дозе 100 млн микробных клеток в объеме 0,02 мл. На 5, 14, 21 сутки после заражения у мышей, получавших эфирный наркоз, асептически извлекали легкие, промывали их стерильным изотоническим раствором натрия хлорида, гомогенизировали в 2 мл изотонического раствора натрия хлорида и производили посев 0,1 мл гомогенатов на чашки Петри со средой «Бордетеллагар». Чашки помещали в термостат при t $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ на 3 суток, после чего производили учет результатов (оценку интенсивности роста и подсчет отдельных колоний).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований была разработана методика культивирования биопленок *B. pertussis* в пластиковых культуральных флаконах, установлены оптимальные условия культивирования, оптимальные посевные дозы микробных клеток и время культивирования. Установлено, что биопленки формировались только при стационарном выращивании культур, при слабом росте планктонных клеток. При культивировании в шуттель аппарате не наблюдалось формирования биопленок, при высокой концентрации планктонных клеток. Наиболее высокая интенсивность образования биопленок (плотные биопленки) наблюдалась на пятые сутки культивирования при посевой дозе 2,5–5,0 Международных оптических единиц (МОЕ). Таким образом, биопленки формировались только при стационарном выращивании культур, при слабом росте планктонных клеток, по сравнению с культивированием в шуттель аппарате.

Из биопленочных и планктонных культур штамма *B. pertussis* № 317 были выделены антигенные комплексы на основе которых были изготовлены два варианта БКВ: БКВ – Б и БКВ – П, изучены их безвредность и протективная активность.

При изучении гистаминсенситизирующей активности БКВ было установлено, что оба препарата в изучаемых дозах были безвредны и не вызывали гибели мышей при введении гистамина дигидрохлорида, что свидетельствует о безвредности БКВ и полной детоксикации препаратов.

Далее были изучены протективные свойства, полученных вариантов БКВ (таблица № 1). Начало гибели в группе мышей, иммунизированных БКВ-Б отмечена на 5 сутки и продолжалась до 12 дня (срок наблюдения), а в группе мышей, иммунизированных БКВ-П начало гибели мышей была отмечена уже на 4 сутки и закончилась на 8 сутки. При этом в группе мышей, иммунизированных БКВ-Б выжило 33 %, а в группе мышей, иммунизированных БКВ-П выжило 13 %. Относительно низкая доля выживших животных в обеих группах обусловлена высокой дозой введенной культуры вирулентного штамма. ЛД₅₀ культуры была равна 58 микробным клеткам и, соответственно мышам было введено 1724 ЛД₅₀ (по рекомендациям ВОЗ должно быть введено не менее 100 ЛД₅₀ и не более 1000 ЛД₅₀). Тем не менее, из приведенных данных видно, что протективная активность БКВ-Б была практически в 3 раза выше, чем БКВ-П.

Таблица № 1. Протективная активность БКВ при интрацеребральном заражении

Препарат	Доза в мкг/мышь	Кол-во мышей на дозу	Гибель мышей (сутки после заражения)								Количество выживших	
			4	5	6	7	8	9	11	12	Абс.	%
БКВ-Б	25	15	-	5	2	-	1	-	1	1	5	33
БКВ – П	25	15	5	5	2	-	1	-	-	-	2	13
Контроль культуры вирулентного штамма	Количество микробных клеток/мышь	Кол-во мышей на дозу	Гибель мышей (сутки после заражения)								Количество павших	
			4	5	6	7	8	9	11	12	Абс.	%
	80	10	5	2	-	-	1	-	-	-	8	80
	400	10	6	1	-	-	1	-	1	-	9	90
	2000	10	6	4	-	-	-	-	-	-	10	100
	10000	10	4	6	-	-	-	-	-	-	10	100
Заражающая доза/ЛД ₅₀	100000/1724	10	8	2	-	-	-	-	-	-	10	100

В последующих опытах было изучено влияние полученных вариантов БКВ на персистенцию микробных клеток *B. pertussis* в легких мышей зараженных интраназально культурой вирулентного штамма (таблица № 2).

Из приведенных в таблице № 2 данных видно, что БКВ-Б и БКВ-П существенно отличались между собой по влиянию на уровень колонизации легких микробными клетками *B. pertussis*. В группе БКВ-Б на 5 сутки был зарегистрирован рост отдельных колоний в количестве от 156 до 185 в первом опыте и от 151 до 195 во втором. На 14 сутки количество колоний снизилось до 37–44 в первом опыте и 54–60 во втором, а на 21 сутки роста не было. В группе БКВ-П на 5 сутки у большинства мышей был выявлен сплошной рост культуры. На 14 сутки культуры представляли собой отдельные колонии с участками сливного роста. На 21 сутки регистрировались отдельные колонии в количестве от 173 до 187 в первом опыте и 113–146 во втором. Микробные клетки росли на плотной питательной среде в виде характерных для *B. pertussis* – мелких колоний от 0,5 до 1,0 мм в диаметре, выпуклых, круглых,

с ровными краями, сероватого цвета, блестящих (в виде "жемчужин"), полупрозрачных. В мазках, окрашенных по Граму, при микроскопии (объектив 90^x окуляр 7^x) микробные клетки представляли собой типичные для *B. pertussis* грамтрицательные, овоидной формы, мелкие палочки (коккобактерии), располагавшиеся в мазках отдельно или парами. На отдельных участках питательной среды у части чашек Петри был зарегистрирован рост колоний, не характерных для *B. pertussis*, вероятно за счет контаминации другими микроорганизмами. В целом, приведенные данные указывают на более высокое снижение уровня колонизации легких микробными клетками *B. pertussis* у мышей, иммунизированных БКВ-Б, по сравнению с БКВ-П.

Таблица № 2. Персистенция микробных клеток *B. pertussis* в легких мышей при интраназальном заражении (рост посевов гомогенатов легких на плотной питательной среде)

Препарат	Общее кол-во мышей/	Опыт I			Опыт II		
		Интенсивность роста культур (сутки после заражения)					
		5	14	21	5	14	21
БКВ-Б	30	185*	40*	-	195*	60*	-
		160*	44*	-	187*	54*	-
		156*	38*	-	151*	63*	-
		178*	37*	-	193*	58*	-
		183*	42*	-	186*	56*	-
БКВ-П	30	Сплошной	>200	180*	Сплошной	Сплошной	120*
		Сплошной	>200	173*	Сплошной	>200	146*
		>200	>200	187*	Сплошной	>200	113*
		Сплошной	>200	>200	Сплошной	Сплошной	90*
		Сплошной	>200	179	Сплошной	>200	125*
Контроль культуры вирулентного штамма (неиммунизированные мыши)	12	Сплошной	Сплошной	>200	Сплошной	Сплошной	>200
		Сплошной	Сплошной	>200	Сплошной	Сплошной	>200
Интактные мыши	12	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-

(–) – отсутствие роста, (*) – количество отдельных колоний, (>200) – более точный подсчет затруднен (сливной рост на отдельных участках)

(-) – отсутствие роста, (*) – количество отдельных колоний, (>200) – более точный подсчет затруднен (сливной рост на отдельных участках)

Заключение

Приведенные данные свидетельствуют о более высокой протективной активности БКВ из биопленочной культуры *B. pertussis*, по сравнению с БКВ из планктонной культуры. Более высокая протективная активность БКВ-Б может быть обусловлена более высоким уровнем экспрессии протективных антигенов *B. pertussis* биопленками, по сравнению с планктонными культурами.

Литература

1. Ломоносова А.В. Причины и последствия несвоевременной вакцинации против коклюшной инфекции в Российской Федерации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020; 97(5):492 – 52. DOI:https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-11.
2. Yeung K.H.T., Duclos P., Nelson E.A.S., et al. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study // Lancet Infect. Dis. 2017; 17(9):974–980. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30390-0.
3. Fullen A.R., Yount K.S., Dubey P., et al. Whoop! There it is: The surprising resurgence of pertussis // PLoS Pathog. 2020; 16(7):e1008625. doi:10.1371/journal.ppat.1008625.
4. Cattelan N., Dubey P., Arnal L. Et al. Bordetella biofilms: a lifestyle leading to persistent infections // Pathog. Dis. 2016; 74(1). DOI: 10.1093/femspd/ftv108.
5. Carriquiriborde F. et al. Vaccine Candidate Based on Outer Membrane Vesicles Derived From Biofilm Culture. Front Immunol. 2021; 12: 730434. doi: 10.3389/fimmu.2021.730434.
6. МУК 4.2.2317–08 Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий. Москва. 2009].
7. Зайцев Е.М. и др. Культивирование биопленок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019; (1):49-53. DOI:10.36233/0372-9311-2019-1-49-53.
8. Зайцев Е.М. и др. Бесклеточная коклюшная вакцина из антигенов свежевыделенных и вакцинного штаммов *Bordetella pertussis* с различными генотипическими характеристиками. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2021; 20(4):68–72. https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-4-68-72
9. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л: 1962.
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунологические лекарственные препараты). Ч. 2 МЗ РФ. Москва 2012.