

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован
Комитетом РФ по печати
30.09.1999 г. (№019273)
Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2021.

Содержание

Болезни и возбудители

Сацук А.В., Солопова Г.Г., Чурилова Н.С., Власенко Н.В., Панасюк Я.В., Плоскирева А.А., Акимкин В.Г.

- 340** Вирусный гепатит С у иммунокомпрометированных пациентов педиатрического профиля: эпидемиологический анализ данных центра детской гематологии, онкологии и иммунологии

Баранова И.Б., Яременко А.И., Зубарева А.А., Карпищенко С.А., Попова М.О., Курьсь А.А., Портнов Г.В., Пинегина О.Н., Лукина О.В., Маляревская М.В., Калакуцкий И.Н., Илюхина М.О., Климо Н.Н.

- 347** Мукормикоз костей лицевого черепа, полости носа и околоносовых пазух у пациентов, перенесших COVID-19

Степин А.В.

- 359** Структура возбудителей и основные проблемы антибиотикорезистентности при инфекции области хирургического вмешательства в кардиохирургии

Антимикробные препараты

Сычев И.Н., Федина Л.В., Сычев Д.А.

- 367** Антибактериальная терапия в условиях полипрагмазии: курс на безопасность

Антибиотикорезистентность

Гостев В.В., Пунченко О.Е., Сидоренко С.В.

- 375** Современные представления об устойчивости *Staphylococcus aureus* к бета-лактамам антибиотикам

Садеева З.З., Новикова И.Е., Шакирзянова Р.А., Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Мелков М.С., Карасева О.В., Вершинина М.Г., Фисенко А.П.

- 388** Молекулярно-генетическая характеристика механизмов антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, выделенных из крови и ликвора у детей

Опыт работы

Лёдов В.А.

- 400** Определение функциональных и антиген-специфических антител в сыворотке у мышей после иммунизации кандидатной вакциной против *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y

Умпелева Т.В., Еремеева Н.И., Вахрушева Д.В.

- 404** Разработка технологии длительного хранения культур микобактерий туберкулеза

Определение функциональных и антиген-специфических антител в сыворотке у мышей после иммунизации кандидатной вакциной против *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y

Лёдов В.А.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Контактный адрес:
Владимир Алексеевич Лёдов
Эл. почта: vldov@mail.ru

Ключевые слова: липополисахарид, *Shigella flexneri*, вакцина, антитела, бактериолитический анализ сывороток, опсонофагоцитарная реакция.

Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Сравнить методы определения функциональной активности антител у мышей, иммунизированных пентавалентным вакцинным кандидатом против *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y.

Материалы и методы. Мышей (СБА x C57 B1/6) F1 иммунизировали пентавалентным вакцинным кандидатом против *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y (ПФ). Через 14 дней после повторной иммунизации собирали образцы сывороток и определяли в них уровень специфических IgG методом твердофазного ИФА. Для положительного контроля использовали сыворотки мышей, иммунизированных отдельными модифицированными липополисахаридами (мЛПС), которые входят в состав ПФ. Отрицательным контролем служили сыворотки интактных мышей. Функциональная активность сывороточных антител была определена методами бактериолитического анализа сывороток (СБА) и опсонофагоцитарной реакции (ОПФР). Результат оценивали по проценту уничтоженных бактерий.

Результаты. Во всех опытных группах мышей наблюдается рост титра специфических IgG ($p < 0,05$). Конечный титр (КТ) антител к ЛПС *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y в группе мышей, иммунизированных ПФ, достоверно не отличается от КТ у групп после иммунизаций отдельными мЛПС. При этом показатели в опытных группах примерно в 16 раз выше, чем в контрольной. Для определения функциональной активности *S. flexneri*-специфических антител в сыворотках мышей, иммунизированных ПФ, были использованы методы СБА и ОПФР. Доля уничтоженных бактерий в СБА составила 54%, 66%, 35%, 60%, 60% для *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y серотипов соответственно. При постановке ОПФР в группах иммунизированных мышей этот показатель был равен 37%, 55%, 27%, 56%, 53% для *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y серотипов соответственно.

Выводы. ПФ индуцирует выработку специфических анти-ЛПС IgG сравнимо с его отдельными компонентами. Сыворотки ПФ иммунизированных мышей содержат функциональные антитела. СБА и ОПФР эффективны для использования в мышинной модели. СБА является более чувствительным методом определения функциональных антител, поскольку доля уничтоженных бактерий составляет более 10%.

Original Article

Functional and antigen-specific serum antibodies in mice after immunization with a candidate vaccine against *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y

Ledov V.A.

National Research Center «Institute of Immunology», Moscow, Russia

Contacts:
Vladimir A. Ledov
E-mail: vldov@mail.ru

Key words: lipopolysaccharide, *Shigella flexneri*, vaccine, serum bactericidal antibody, opsonophagocytic killing antibody.

Conflicts of interest: author reports no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To determine functional anti-LPS specific serum bactericidal antibody (SBA) and opsonophagocytic killing antibody (OPKA) activities in mice immunized with a pentavalent candidate vaccine against *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y (PF).

Materials and methods. (CBA x C57 B1/6) F1 mice were immunized with a PF. 14 days after the re-immunization, serum samples were collected and the level of specific IgG in them was determined by ELISA. The sera of mice immunized with individual modified lipopolysaccharides (mLPS), which are part of PF, were used for positive control. Serum from intact mice served as a negative control. The functional activity of serum antibodies was determined by the methods of SBA and OPKA assay. The result was evaluated by the percentage of bacteria killed.

Results. In all experimental groups of mice, an increase in the titer of specific IgG is observed ($p < 0.05$). The endpoint titer (ET) of anti-LPS *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y antibodies in the group of mice immunized with PF does not significantly differ from ET in the groups after immunizations with individual mLPS. At the same time, the indicators in the experimental groups are about 16 times higher than in the control. We determined a functional activity of *S. flexneri*-specific SBA and OPRA in mice immunized with PF. The rate

Лёдов В.А.

of SBA killing was 54%, 66%, 35%, 60%, 60% for *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y serotypes, respectively. When OPKA killing in groups of immunized mice are 37%, 55%, 27%, 56%, 53% for *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y serotypes, respectively.

Conclusions. PF induces the production of specific anti-LPS IgG comparable to its individual components. The sera from PF immunized mice contain functional antibodies. Serum bactericidal and opsonophagocytic assay are effective for use in a mouse model.

Введение

Дизентерия – острый инфекционный колит, вызываемый бактериями рода шигелла. Дизентерия распространена повсеместно. Ежегодно в мире регистрируется около 188 млн случаев шигеллёза, из них 62 млн приходится на детей младше 5 лет [1]. Основные группы риска для шигеллёза – это дети младше 5 лет и пожилые люди, проживающие в неблагоприятных условиях, путешественники по эндемичным районам, дети в детских садах и детских лагерях [2–4]. В странах с низким и средним уровнем дохода доминирует возбудитель *Shigella flexneri* [1]. Примерно у 90% больных дизентерией были выявлены серотипы/субсеротипы *S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 2b, *S. flexneri* 3a, *S. flexneri* 6 и *S. flexneri* 1b [5].

Шигелла-специфичные антитела, преимущественно IgG, играют важную роль в защите организма от шигеллёза. У детей и взрослых, проживающих в эндемичных для шигеллёза районах, были выявлены клетки, продуцирующие антитела, и сывороточные IgG, специфичные к липополисахаридам (ЛПС) и к плазмидам инвазии (Ipa) шигелл [6].

Нативный ЛПС (нЛПС) токсичен, поэтому использование его в качестве активного компонента вакцины невозможно. нЛПС построен из О-полисахарида, «ядра» и липида А. О-полисахаридная цепь нЛПС может содержать от 1 до 15 тетрасахаридных блоков, липид А – от 3 до 6 остатков высших жирных кислот.

Мы используем метод детоксикации ЛПС [7] для создания пентавалентного вакцинного кандидата против шигелл Флекснера 1b, 2a, 3a, 6, Y (ПФ). У модифицированных ЛПС (мЛПС), входящих в состав кандидатной вакцины, липид А содержит 3 остатка ненасыщенных жирных кислот, а полисахаридная цепь – 10–15 повторяющихся тетрасахаридных блоков. Подобные мЛПС *S. flexneri* апиогенны в модели пирогенности на кроликах и безопасны для вакцинации людей [7].

Цель исследования – сравнить методы определения функциональной активности антител у мышей, иммунизированных пентавалентным вакцинным кандидатом против *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y.

Материалы и методы

Иммунизация мышей

Группы мышей (СВА х C57 B1/6) F1 (5 особей в группе) были иммунизированы интраперитонеально ПФ дозой 125 мкг или отдельно каждым из его компонентов (мЛПС *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, Y, 6) дозами по 25 мкг или 50 мкг. Через 2 недели мышей ревакцинировали. На 15-й день после бустерной иммунизации собирали об-

разцы сывороток и определяли в них уровень специфических IgG методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА).

ТИФА

Нативный ЛПС *S. flexneri* 2a сорбировали на полистироловых планшетах (Greiner, Австрия) в 0,05 М растворе карбонатно-бикарбонатного буфера с pH 9,5, внося по 100 мкл раствора антигена в лунку. Готовили двукратные разведения исследуемых сывороток, начиная с разведения 1:50. В качестве детектирующего реагента использовали меченые пероксидазой хрена козы антитела к мышиным IgG (Sigma-Aldrich, США). Учет реакции производили с помощью спектрофотометра iMark (Bio-Rad, США) при длинах основной/возвратной волн 460/630 нм.

Условия культивирования *S. flexneri*

Культура *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, Y, 6 была высеяна в бульон Хоттингера (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Россия) с последующей инкубацией в течение 18–24 ч. при температуре 37°C (5% CO₂). Раннюю лог-фазу определяли фотометрически OD₅₉₅ – 0,4 ± 0,02. Бактерии были перенесены в фосфатный буферный раствор (ФБР) для постановки бактериолитического анализа сывороток (СБА) мышей или в опсонофагоцитарный буфер (ОПФБ), содержащий раствор Хэнкса с солями Mg и Ca + 1% желатин + 5% ФБР, для постановки опсонофагоцитарной реакции (ОПФР).

Бактериолитический анализ сывороток мышей

Инактивированные нагреванием сыворотки мышей в ФБР вносили по 40 мкл в лунки 96-луночного планшета. Затем в каждую лунку добавляли по 10 мкл комплемента морской свинки («Микроген», Россия) и 10 мкл *S. flexneri* (1000 КОЕ) в ФБР. Конечный объем в лунке составил 60 мкл, а рабочее разведение сыворотки – 1/15. Полученную смесь ставили на шейкере (200 об/мин) в CO₂-инкубатор на 30 мин. при температуре 37°C (5% CO₂). По истечении срока инкубации 10 мкл смеси переносили на КА. Подсчет КОЕ осуществлялся после 18–24 ч. инкубирования при температуре 37°C (5% CO₂).

Опсонофагоцитарная реакция

Инактивированные нагреванием сыворотки мышей в разведении 1/10 в ОПФБ вносили в количестве 40 мкл в лунки 96-луночного планшета. Затем в каждую лунку добавляли по 10 мкл комплемента морской свинки («Микроген», Россия) и 10 мкл *S. flexneri* (1000 КОЕ)

в ОПФБ и ставили на шейкере в CO₂-инкубатор на 30 мин. при температуре 37°C (5% CO₂). По истечении срока инкубации в каждую лунку планшета вносили по 40 мкл 2 × 10⁵ дифференцированных диметилформамидом клеток HL-60 (подтверждали микроскопией после окраски по Романовскому – Гимзе) и снова инкубировали 60 мин. в тех же условиях. По истечении срока инкубации 10 мкл смеси из каждой лунки пересевали на чашки Петри с кровяным агаром и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч. при температуре 37°C (5% CO₂). В контрольные лунки добавляли сыворотки интактных мышей.

Статистическая обработка данных

Данные по иммуногенности были оформлены с использованием GrafPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., США). Показатели у групп мышей сравнивали с использованием Т-критерия при $p < 0,05$. Для методов СБА и ОПФР процент уничтоженных бактерий определяли по формуле $[1 - (\text{КОЕ выживших бактерий}/\text{общее КОЕ})] \times 100$.

Результаты

Во всех группах мышей, иммунизированных как ПФ, так и его отдельными компонентами, наблюдался рост титра специфических IgG ($p < 0,05$). В группах мышей, иммунизированных 25 мкг мЛПС *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y, КТ IgG составил 1392,9 ± 979,8; 1212,6 ± 1402,9; 1212,6 ± 438,2; 2425,1 ± 2146,6; 1212,6 ± 1043,1. Антительный ответ у мышей не изменялся по мере увеличения дозы с 25 мкг до 50 мкг мЛПС. В группе мышей, иммунизированных ПФ, КТ IgG к ЛПС *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y составил 1212,6 ± 438,2; 1392,9 ± 979,8; 1055,6 ± 438,2; 2785,8 ± 2629,1; 1600,0 ± 2359,7 соответственно (Рисунок 1). Данные результаты

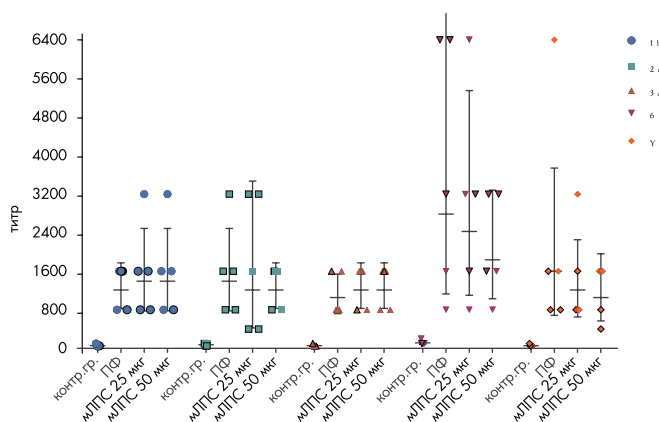


Рисунок 1. Антительный ответ у мышей после иммунизации ПФ и его отдельными компонентами (мЛПС 1b, 2a, 3a, 6, Y)

В группах мышей, иммунизированных мЛПС в дозах 25 мкг и 50 мкг, а также в группе, иммунизированной ПФ, наблюдалось увеличение титра специфических IgG ($p < 0,05$) в сравнении с титрами в контрольной группе интактных мышей. Данные представлены как геометрическое среднее ± стандартное отклонение.

существенно не отличались от показателей в группе мышей, иммунизированных каждым из компонентов ПФ по отдельности. При этом показатели в опытных группах были примерно в 16 раз выше, чем в контрольной.

Для определения функциональной активности *S. flexneri*-специфических антител в сыворотках мышей, иммунизированных ПФ, были использованы методы СБА и ОПФР. При использовании СБА спонтанная нейтрализация *S. flexneri* исследуемых серотипов сывороткой интактных мышей составила < 15%. После иммунизации ПФ регистрировалось существенное увеличение бактериолитической активности мышиных сывороток против вирулентных штаммов *S. flexneri*. Доля уничтоженных бактерий составила 54%, 66%, 35%, 60%, 60% для *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y серотипов соответственно. Аналогичная картина наблюдалась и при постановке ОПФР. Спонтанное уничтожение бактерий – < 10%, в группах иммунизированных мышей показатели составили 37%, 55%, 27%, 56%, 53% для *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y серотипов соответственно.

Обсуждение

ЛПС является одним из главных факторов вирулентности бактерий *S. flexneri*. В свободном состоянии ЛПС опосредует быстрое развитие воспаления благодаря липиду А. Секреция провоспалительных цитокинов,

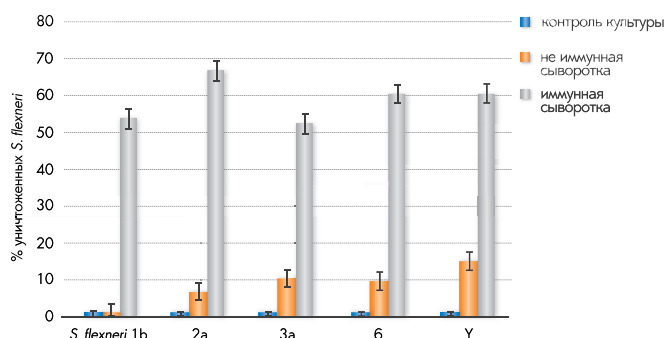


Рисунок 2. Бактериолитическая активность сывороток мышей, иммунизированных ПФ против *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y

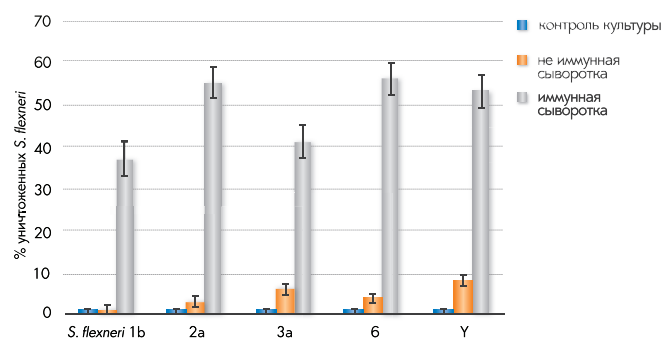


Рисунок 3. Опсонофагоцитарная активность сывороток мышей, иммунизированных ПФ против *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y

таких как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 ФНО- α , запускается при взаимодействии липида А с TLR-4 клеток макроорганизма [8, 9]. В отличие от своего нативного предшественника, мЛПС существенно меньше активируют выработку провоспалительных цитокинов в лейкоцитах здоровых доноров и безопасны для клинического использования [7].

Для создания пентавалентной кандидатной вакцины были отобраны мЛПС эпидемически значимых штаммов, обладающие выраженной иммуногенностью. После софизации мЛПС, полученных от серотипов *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y, прирост титра IgG у мышей не стал ниже (Рисунок 1). Наши исследования доказали взаимосвязь между специфическими анти-ЛПС IgG и функциональными антителами. Для этого сыворотки мышей, иммунизированных ПФ, исследовали методами СБА и ОПФР.

СБА оказался более чувствительным методом определения функциональных антител, поскольку доля уничтоженных бактерий составила более 10% (Рисунки 2

и 3). Одной из возможных причин может быть сложность ОПФР, включающая опсонизацию антителами, связывание комплемента, фагоцитоз и уничтожение в отличие от активации комплемента и уничтожения бактерий в СБА.

Антитело-зависимое комплемент-опосредованное уничтожение бактерий и опсонофагоцитарная активность ассоциируются с защитой против бактериальных патогенов [10, 11]. Наши результаты подтверждают протективную эффективность антител у мышей после иммунизации ПФ.

Заключение

Полученные в исследовании данные свидетельствуют о высокой иммуногенности ПФ. Методы СБА и ОПФР могут быть эффективны для прогнозирования протективной активности вакцинных препаратов на более доступных не патогномичных моделях животных.

Литература

- Kotloff K.L., Riddle M.S., Platts-Mills J.A., Pavlinac P., Zaidi A.K.M. Shigellosis. Lancet. 2018;391(10122):801-812. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33296-8
- Kotloff K.L., Nataro J.P., Blackwelder W.C., Nasrin D., Farag T.H., Panchalingam S., et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. Lancet. 2013;382(9888):209-222. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2
- Gilbart V.L., Simms I., Jenkins C., Furegato M., Gobin M., Oliver I., et al. Sex, drugs and smart phone applications: findings sex with men diagnosed with *Shigella flexneri* 3a in from semistructured interviews with men who have England and Wales. Sex Transm Infect. 2015;91(8):598-602. DOI: 10.1136/sextrans-2015-052014
- Shah N., Ldupont H., Ramsey D.J. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. Am J Trop Med Hyg. 2009;80(4):609-614. PMID: 19346386
- Livio S., Strockbine N.A., Panchalingam S., Tennant S.M., Barry E.M., Marohn M.E., et al. *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. Clin Infect Dis. 2014;59(7):933-941. DOI: 10.1093/cid/ciu468
- Shimanovich A.A., Buskirk A.D., Heine S.J., Blackwelder W.C., Wahid R., Kotloff K.L., et al. Functional and antigen-specific serum antibody levels as correlates of protection against shigellosis in a controlled human challenge study. Clin Vaccine Immunol. 2017;24(2):e00412-16. DOI: 10.1128/CVI.00412-16
- Ledov V.A., Golovina M.E., Markina A.A., Knirel Y.A., L'vov V.L., Kovalchuk A.L., et al. Highly homogenous triacylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. Vaccine. 2019;37(8):1062-1072. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.12.067
- Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. Int J Med Microbiol. 2007;297(5):353-363. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.04.001
- Stephens M., von der Weid P-Y. Lipopolysaccharides modulate intestinal epithelial permeability and inflammation in a species-specific manner. Gut Microbes. 2019;11(3):421-432. DOI: 10.1080/19490976.2019.1629235
- Granoff D.M., Lucas A.H. Laboratory correlates of protection against *Haemophilus influenzae* type b disease: importance of assessment of antibody avidity and immunologic memory. Ann N Y Acad Sci. 1995;754(1):278-288. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb44461.x
- Goldschneider I., Gotschlich E.C., Artenstein M.S. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. J Exp Med. 1969;129(6):1307-1326. DOI: 10.1084/jem.129.6.1307