

ПРОТЕКТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ РОЗРОБЛЕНИХ ЗРАЗКІВ ФАГОЛІЗАТНОЇ СИНЬОГНІЙНОЇ ВАКЦИНИ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ)

¹Деркач С.А., ¹Мартинів А.В., ¹Городницька Н.І.,
¹Куцай Н.М., ²Габишева Л.С.

¹Державна установа «Інститут мікробіології та
імунології ім. І.І. Мечникова
Національної академії медичних наук України»

²Харківський національний медичний університет

Вступ. Одним із основних збудників гнійно-запальних захворювань, у тому числі внутрішньолікарняних, залишається синьогнійна паличка – *P. aeruginosa*. Збудник має широкий серогруповий пейзаж, володіє полірезистентністю до антибіотиків, високою стійкістю до дезінфектантів, асептиків, факторів зовнішнього середовища. В опікових стаціонарах, в травматологічних відділеннях, у шпиталях лікування завжди пов'язане з тривалим перебуванням у лікарняних умовах, що значно збільшує ризик інфікування нозокоміальними бактеріями, серед яких домінують псевдомонади.

Явного прогресу в засобах лікування цієї інфекції не спостерігається. В умовах вельми актуальної проблеми антибіотикорезистентності нагальною необхідністю є створення вакцинних препаратів для профілактики і лікування синьогнійної інфекції [1,2,3].

При використанні традиційних методів для створення вакцин, спочатку застосовують методи вилучення протективних антигенів із бактеріальної клітини, для чого проводять нарощування великих об'ємів біомаси, застосовують різні хімічні реагенти, багаторазово очистки та концентрацію активних елементів, що зумовлює високі виробничі втрати.

Крім того, не гарантується повна відсутність домішків, хімічних речовин – консервантів (фенолу, мертиоляту, формаліну), що може викликати небажані реакції організму вакцинованих [4].

Пошук нових підходів до створення імунних препаратів продовжується в різних країнах світу. В Україні вакцинні препарати для профілактики і лікування синьогнійної інфекції відсутні, тому їх розробка і вітчизняне виробництво є перспективним, актуальним та соціально і економічно обґрунтованим.

Одним із сучасних напрямків досліджень вчених різних країн є застосування технологій знезараження бактерій і отримання імуногенів шляхом інактивації вихідного продуцента фотодинамічним методом [5,6,7,8].

Перевагою даного способу перш за все є універсальна ефективність інактивації різних бактерій (незалежно від серотипу, фаговару, тощо), вірусів, екзо- та ендотоксинів.

При виконанні науково-дослідної роботи нами був розроблений та запатентований спосіб

отримання синьогнійної вакцини шляхом застосування бактеріофагів, адаптованих до актуальних штамів-збудників гнійно-запальних захворювань, використання у якості фотосенсибілізаторів флавінів - менадіону натрія бісульфату – синтетичного водорозчинного аналогу вітаміну К (вікасол), та рибофлавіну мононуклеотиду (вітамін В₂) з наступним опроміненням блакитним світлом фотополімерної лампи (440 нм) та ультрафіолетовими променями (220-300 нм) [9].

Матеріали та методи досліджень. Для отримання вакцинних зразків методом фаголізу та фотодинамічної інактивації штамів-кандидатів використовували культури актуальних штамів із різних біотопів хворих на гнійно-запальні захворювання штамів

P. aeruginosa, специфічні адаптовані бактеріофаги, у якості фотосенсибілізаторів - 0,1 % розчин рибофлавіну та 1,0 % - вікасолу (виробництва Україна, "Дарниця") , а опромінення здійснювали з застосуванням фотополімерної лампи «Люксеор» та ультрафіолетовим опроміненням бактерицидної лампи у ламінарному боксі [9, 10].

Протективні властивості вакцинних препаратів вивчали в експерименті на неімбредних мишах шляхом визначення показників виживаності тварин після контрольного зараження гомологічними та гетерологічними штамми *P. aeruginosa*.

Протективну активність вакцинних зразків оцінювали у порівнянні з контрольною (невакцинованою) групою інфікованих тварин, керуючись методиками, рекомендованими ВООЗ та іншими дослідниками.

Отримані результати досліджень оброблено методом варіаційної статистики з використанням програми MS Excel 2003, з визначенням показника достовірності різниці за критерієм χ^2 та однофакторним дисперсійним аналізом ($p < 0,05$) [11].

Метою та основним завданням дослідження було визначення протективних властивостей вакцинних препаратів, отриманих новим методом при інфікуванні як гомогенними, так і гетерогенними штамми *P. aeruginosa*.

Результати та обговорення. В лабораторних умовах нами було отримано по 3 серії моновакцини і 2 серії мультиштамової вакцини з 5 штамів *P. aeruginosa* . Вміст білка в них коливався від 0,21 до 3,11 мг/мл.

Результати порівняльного вивчення отриманих серій вакцинних монопрепаратів із штамів з різною вихідною характеристикою показали, що всі вони забезпечували приблизно однаковий захисний ефект відносно зараження гомологічними штамми (таблиця 1).

Показана висока ефективність вакцинації дослідних мишей, в результаті якої летальність при зараженні аутоштамами через різні періоди після імунізації, починаючи з 3 доби, була незначною і в порівнянні з невакцинованими – достовірно меншою ($p < 0,01$).

Таблиця 1. - Ефективність імунізації отриманими зразками моновакцин при інфікуванні відповідними (однотиповими) штамами *P. aeruginosa*

Група тварин	№ підгрупи	Доза та метод введення вакцини	Період введення інфікуючої дози культури <i>P. aeruginosa</i> *	штам для зараження тварин, №	Результат дослідження	
					Вижило	Загибло
1	2	3	4	5	6	7
I	1	0,2 мл підшкірно	через 3 доби	13	8	2
	2	вакциною зі штаму №	через 7 діб	13	10	0
	3	13	через 15 діб	13	9	1
II	4	0,2 мл підшкірно	через 3 доби	47	8	2
	5	вакциною зі штаму №	через 7 діб	47	9	1
	6	47	через 15 діб	47	10	0
III	10	Невакциновані		13	2	8
	11	(контрольна група)		47	1	9

Примітка: * – інфікуюча доза культури *P. aeruginosa* рівнялась $2LD_{50}$ кожного відповідного штаму, метод введення - 0,5мл внутрішньочеревинно.

Візуальний огляд внутрішніх органів тварин при розтині вакцинованих тварин після 21 дня спостереження показав: патологічних проявів не виявлено, за розміром, кольором, консистенцією внутрішні органи не відрізняються від таких у групі інтактного контролю. При висіві промивних вод черевної порожнини зростання *P. aeruginosa* відсутнє.

У групі контрольних тварин, що загинули протягом 1-15 діб після зараження, мали місце септичні прояви, підвищення ректальної температури, абсцеси в легенях, печінці, набряк та гіперемія в черевній порожнині. Культури синьогнійної палички висівалися із крові та з пунктів черевної порожнини з перших днів після інфікування.

При розтині в черевній порожнині тварин спостерігали набряк, некроз брюшини (рис.1).



Рисунок 1. - Некроз органів черевної порожнини в миші з контрольної (невакцинованої) групи, зараженої культурою *P. aeruginosa*

При посіві промивних вод черевної порожнини виявлений рясний ріст (10^8 КУО/мл) культури *P. aeruginosa*. За період 7 діб усі тварини контрольної групи загинули.

Аналіз причин загибелі незначної кількості вакцинованих тварин показав, що вона відмічалась в основному на 10-14 день, в той час як у контрольній групі у 80% випадків загибель мала місце у перші 5 днів. Тобто, вакцинація продовжувала життя інфікованим мишам ($p < 0,05$).

Результати, наведені в таблиці 2, показують, що період введення інфікуючої дози (3-7 чи 15 діб) не мав значення для прояву ефективності вакцинації ($p > 0,05$). Кількість тварин, що вижили після інфікування гетерогенними штамами *P. aeruginosa* в усіх експериментах також була достовірно меншою, ніж у контрольній (невакцинованій) групі ($p < 0,05$).

Таблиця 2. - Ефективність імунізації отриманими зразками моновакцин при інфікуванні гетерогенними штамами *P. aeruginosa*

Група тварин	№ підгрупи	Доза та метод введення вакцини	Період введення інфікуючої дози культури <i>P. aeruginosa</i> *	штам для зараження тварин, №	Результат дослідження	
					Вижило	Загинуло
1	2	3	4	5	6	7
I	1	0,2 мл підшкірно вакциною зі штаму № 13	через 3 доби	47	7	3
	2		через 7 діб	47	9	1
	3		через 15 діб	47	9	1
II	4	0,2 мл підшкірно вакциною зі штаму № 47	через 3 доби	13	7	3
	5		через 7 діб	13	7	3
	6		через 15 діб	13	8	2
III	7	0,2 мл підшкірно вакциною зі штаму № 62	через 3 доби	АТСС № 27853	8	2
	8		через 7 діб	АТСС № 27853	9	1
	9		через 15 діб	АТСС № 27853	9	1
IV	10	Невакциновані (контрольна група)		штам №13	2	8
	11			штам № 47	1	9
	12			штам АТСС № 27853	3	7

Примітка: * – інфікуюча доза культури *P. aeruginosa* рівнялась $2LD_{50}$ кожного відповідного штаму, введення - 0,5мл внутрішньочеревинно, χ^2 показників всіх дослідних груп відносно показників контролю відповідає $p < 0,05$.

Давно підтверджена наявність спільних антигенних компонентів у штамів *P. aeruginosa* різних серотипів. За даними Н.С. Акатової та Н.Є. Смирнової, при вивченні специфічності отриманих до 25-типових штамів псевдомонад аглютинуючих сироваток, лише 4 можна було розцінювати як монопрепарати, оскільки вони були дійсно серотиповоспецифічними (сироватки 04, 09, 011, 012). Решта містили антитіла до спільних антигенів відразу кількох інших серогруп (від 13 до 25) [12].

З метою отримання діагностичних сироваток, де дійсно важливо отримати монопрепарати, проводять адсорбцію сироватки штамами гетерологічних серогруп.

Для стимуляції синтезу протективних антитіл при вакцинації якраз навпаки - більш доцільно застосовувати вакцину, до складу якої входить різні штами-кандидати, різних серотипів, з різною характеристикою (нозокоміальні та позалікарняні, антибіотикочутливі та полірезистентні, фагочутливі та фагостійкі, вилучені із різних біотопів хворих, тощо).

Такої характеристиці найбільш відповідає мультиштамова вакцина, до складу якої можуть бути включені регіональні, найбільш актуальні штами синьогнійної палички. При цьому, безумовно, важливою проблемою є застосування такого способу отримання вакцин, який би не потребував складних методів очистки та стандартизації, не викликав би алергічних реакцій та забезпечив би високопротективну активність без постійного моніторингу серотипового пейзажу.

Саме тому, основним завданням було розробити спосіб отримання фаголізатної мультиштамової синьогнійної вакцини на основі застосування методу фотодинамічної інактивації вихідних штамів-кандидатів *P. aeruginosa* та визначити експериментальним шляхом її протективні властивості.

На лабораторних мишках була вивчена протективна активність трьох серій мультиштамової вакцини, до складу якої увійшли компоненти 5 штамів *P. aeruginosa*, різних за біологічними властивостями, вилучених із різних біотопів:

- 2 штами антибіотикорезистентні позалікарняні (№13, 47);
- 2 штами антибіотикорезистентні внутрішньолікарняні (№18, 62);
- 1 штама антибіотикочутливий (АТСС № 27853).

Мультиштамова вакцина являє собою суміш отриманих розробленим способом моновакцин, взятих в рівних пропорціях. Інфікування вакцинованих мишок проводили через 7 днів після закінчення курсу імунізації (трикратної, з інтервалом 1-2 дні) свіже приготованим зависом культури *P. aeruginosa* у дозі 2 LD₅₀ в 1 мл. При цьому зараження дослідних тварин здійснювали як штамами, що були задіяні при отриманні мультиштамової вакцини (№13, 47, 62), так і іншими гетерогенними штамами (№ 4, 18, 52). Як видно з таблиці 3, у всіх випадках мала місце достовірна різниця при порівнянні показників виживаності у вакцинованих та дослідних тварин (p<0,01).

Більш того, мультиштамова вакцина захищала імунізованих мишей від зараження як аутоштамами, так і від гетерогенних штамів *P. aeruginosa*, що не входили до складу вакцини, оскільки достовірної

різниці по показнику виживаності не виявлено ($\chi^2=1,3$; p>0,05).

При цьому життєздатність дослідних тварин коливались (від 78,6 % до 88,9 %, а в контролі - від 18,8 % до 22,2 %). Певні відмінності протективної активності вакцини проти окремих штамів можуть залежати від вихідної імуногенності та вірулентності штамів. Адже штами, що відносяться навіть до однієї серогрупи, можуть володіти різною вірулентністю.

Важливо підкреслити, що штамовий склад розробленого імунопрепарату може змінюватись, доповнюватись новими, актуальними для конкретного регіону чи, навіть, клінічного відділення, тощо.

Особливо значимим є той факт, що при зміні епідеміологічної ситуації на конкретній території, при виникненні спалахів інфекції, при необхідності можна швидко, без особливих матеріальних затрат, отримувати нові серії специфічної моно- або мультиштамової вакцини без зміни технології приготування імунопрепарату та додаткових досліджень і затверджень у відповідних структурах.

Таблиця 3. - Показники протективної активності мультиштамової синьогнійної вакцини

Штам для зараження	Група тварин	Число тварин				χ^2	p у порівнянні з контролем
		п всього у групі	Із них вижили				
			абс.	%			
1	2	3	4	5	6	7	
Аутоштами (№№ 13, 47, 62)	Дослідні (вакциновані)	36	32	88,9±5,24	24,8	p<0,01	
	Контроль (невакциновані)	16	3	18,8±9,8			
Гетерогенні штами (№№ 4, 18, 52)	Дослідні (вакциновані)	28	22	78,6±7,75	14,2	p<0,01	
	Контроль (невакциновані)	18	4	22,2±9,8			

Висновки. Отриманій нами фаголізатній мультиштамовій вакцині притаманні протективні властивості як відносно гомологічних, так і гетерогенних штамів *P. aeruginosa*, ця вакцина була нетоксичною та нереактогенною. Показник виживаності вакцинованих мишок при зараженні гомологічним штамом склав 88,9 %, гетерогенними – 78,6 %, (p>0,05).

Імунізація достовірно продовжувала життя дослідних тварин після їх зараження навіть кількома гетерогенними штамами з різною вірулентністю (p<0,05).

Ключові слова: синьогнійна інфекція, фотодинамічна інактивація бактерій, вакцина, протективні властивості вакцини.

Protective properties of designed samples of a *Pseudomonas aeruginosa* vaccine (experimental studies)

Dercach S.A., Martynov AV, Gorodnitskaya N.I., Katsay N.M., Gabysheva L.S.

Introduction. One of the main pathogens of purulent and inflammatory diseases, including multi-different serum groups specificity, remains a *P. aeruginosa*. The pathogen has a wide serogroup landscape, has polyresistance to antibiotics, high resistance to disinfectants, aseptives, external factors. Clear progress in the treatment of this infection is not observed. In a very actual problem of antibiotic resistance, an urgent necessity is the creation of vaccine preparations for the prevention and treatment of pseudomonosis. The search for new approaches to the creation of immune drugs continues in different countries of the world. In Ukraine, vaccine preparations for the prevention and treatment of pseudomonosis infection are absent, so their development and domestic production is promising, relevant and socially grounded. One of the

modern directions of research of scientists from different countries is the use of bacteria decontamination technologies and obtaining immunogens from its by inactivating the original microbial producer with a photodynamic method. We have developed and a patented method for obtaining a synogogeneous vaccine by using bacteriophages adapted to specific freshly used *P. aeruginosa* strains, use as photosensitizers - vikasol and riboflavin followed by irradiation by light. **Materials and methods.** For the production of vaccine samples, cultures of freshly branched from various biotopes of patients with purulent inflammatory diseases of *P. aeruginosa* strains, specific adapted bacteriophages, 0.1% solution of riboflavin and 1.0% vikasol. The irradiation was carried out using a photopolymer lamp "Luxior" and ultraviolet bactericidal lamp in laminar box. The protective properties of vaccine drugs were studied in an experiment on non-inbred mice by determining animal survival rates after control infection with homologous and heterogeneous *P. aeruginosa* strains. The protective activity of vaccine samples was evaluated in comparison with the control (non-vaccinated) group of infected animals. Statistical methods determined the reliability of the difference in indicators (X²). **Results and discussions.** In laboratory conditions, 3 series of monovaccines and 2 series of multistrain vaccines (out of 5 strains were obtained *P. aeruginosa*). The comparative study results of the vaccine monopeparates series received from strains with different baseline characteristics have shown that all of them provided approximately the same protective effect of infection with homologous strains. The high efficiency of vaccination of experimental mice is shown, as a result of which the mortality in the infestation by auto-strain due to different periods after immunization, starting from 3 days, was insignificant (10%) and compared with non-vaccinated - reliably less ($P < 0.01$). Number of animals surviving after infection with heterogeneous strains *P. aeruginosa* in all experiments was also significantly smaller than in the control (non-vaccinated) group ($P < 0.05$). Taking into account the wide serogroup landscape *P. aeruginosa*, the main task was to develop a method for obtaining a phagolysate multistrains pseudomonosis vaccine based on the application of the method of photodynamic inactivation of *P. aeruginosa* candidate strains and determined experimentally with its protective properties. Infection of experimental animals was carried out as strains involved in obtaining a multi-strains vaccine and other heterogeneous strains. In all cases there is a significant difference in comparing survival rates in vaccinated and non-vaccinated animals ($p < 0.01$). The multistrain vaccine protected immunized mice from infection both by autostrain and from heterogeneous strains *P. aeruginosa*, which were not included in the vaccine. **Conclusion.** The resulting phagolysis multistrain vaccine has protective properties as relative to homologous and heterogeneous *P. aeruginosa* strains, was non-toxic and non-reactive. The survival rate of vaccinated mice in infection with a homologous strain has 28.9%, heterogeneous - 78.6%. It is important to emphasize that the strain composition of the developed

immunofactor may vary, supplemented with new, relevant for a particular region or, even, clinical department, etc.

Keywords: pseudomonas infection, photodynamic inactivation of bacteria, vaccine, protective properties of the vaccine.

References:

1. Paterson D. L. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clinical Infectious Diseases*. 2006. 43. 2. 43-48.
2. Stanislavsky E. S., Joo I., Mashilova G. M. et al. Vaccines against *Pseudomonas aeruginosa* infection: 1. Experimental studies. *Vaccine*. 1985. 3. 2. 128-136.
3. Saha S. Takeshita S., Sasaki F. Et al. Multivalent DNA vaccine protects mice against pulmonary infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*. 2006. 24. 37. 6240–6249.
4. Nerobeev V.D., Nerobeev D.V. Vaccination: efficacy and safety, problems and prospects. *News of medicine and pharmacy*. 1988. 10. 21-28.
5. Pat. 8759092B2. US. IPC C12N7/00, A61K39/21, A61K2039/521. Preparation of vaccines using photosensitizers and light. *Appl. № 20110014239A1*. US, field 26.08.2010, publ. 24.06.2014.
6. Meerovich G. A., Tiganova I. G., Makarova E. A., Meerovich I. G. et al. Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins, *J. of Physics: Conference Series*. 2016. 691
7. Robert Owen. Patent on damage to nucleic acids using riboflavin and light. USA. 2012. *Appl. №. 2003026770*. US.
8. Yuan G. New activity for old drug: In vitro activities of vitamin K 3 and menadione sodium bisulfite against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *African Journal of pharmacy and pharmacology*. 2014. 451–454.
9. Method for obtaining a vaccine for prophylaxis and treatment of pseudomonosis: UA Pat. 143248. IPC S12N1 / 04 (2006.01). № u2012908730. declared 07.19.2019. publ. 07.27.2020, *Bul. № 14*. 5 P.
10. Derkach S.A., Kutsay N.M., Gabisheva L.S. *Pseudomonas* infection : a new way of obtaining vaccines. "Medicine in modern conditions of integration development of European countries" abstracts of the International Scientific and Practical Conference. Lublin, Republic of Poland. May 10-11. 2019. Lublin. 2019. 302.
11. Lapach S. M., Chubenko A. V., Babich P. N. Statistical methods in biomedical research using Excel. K.: "MORION". 2001. 408 p.
12. Akatova N.S., Smirnova N.E. Serological classification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microb.* 1982. 7. 87-91.