

Изучение иммуногенности гибридных рекомбинантных белков на основе белков VP6 и VP8 ротавируса человека группы А

И.В. Духовлинов, Е.Г. Богомолова (bogomolovaele@inbox.ru), Е.А. Федорова, А.С. Симбирцев

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург

Резюме

Ротавирусная инфекция – основная причина возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у младенцев и детей младше пяти лет. В течение жизни случаи ротавирусного гастроэнтерита могут повторяться. Ввиду отсутствия препаратов с прямым противоротавирусным действием самым эффективным способом борьбы с данным заболеванием считается своевременная вакцинация. Существующие противоротавирусные вакцины основаны на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, которые размножаются в кишечнике человека, что может приводить к развитию различных осложнений. В данной работе изучали иммуногенность рекомбинантных гибридных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 – активных агентов кандидатной вакцины против ротавируса. В ходе исследования получены высокоочищенные препараты белков в нативных условиях, а также показана их высокая антигенная активность в экспериментах с лабораторными мышами линии Balb/c.

Ключевые слова: ротавирусный гастроэнтерит, вакцина, рекомбинантные гибридные белки

Immunogenic Properties Study of Fusion Recombinant Proteins Based on VP6 and VP8 of Human Rotavirus A

I.V. Dukhovlinov, E.G. Bogomolova (bogomolovaele@inbox.ru), E.A. Fedorova, A.S. Simbirtsev

Federal State Unitary Enterprise «Research Institute of Highly Pure Biopreparations» of the Federal Biomedical Agency of Russian Federation, St. Petersburg

Abstract

Rotavirus infection is the leading cause of severe acute diarrhea among young children worldwide. Contagion with these viruses often leads to severe dehydration of organism. Rotaviral gastroenteritis cases may repeat intra vitam. Because of the absence of drugs with direct action on rotavirus, a timely vaccination is considered the most effective way of this disease's control. Nowadays vaccines based on attenuated alive rotaviral strains are used for this purpose, which can result in different complications. In this work the immunogenicity of recombinant fusion proteins VP6VP8 and FliCVP6VP8 – the crucial active agents of the candidate vaccine against rotaviruses – was studied. As part of the study highly purified proteins preparations in native state were obtained, their high antigenic activity in experiments with laboratory Balb/c mice was demonstrated.

Key words: rotavirus gastroenteritis, vaccine, recombinant fusion proteins

Введение

Ротавирусная инфекция – основная причина возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у младенцев и детей младше пяти лет. Ежегодно данное заболевание уносит жизни около 600 тыс. человек, особенно в развивающихся странах [1]. В России число регистрируемых случаев ротавирусного гастроэнтерита постоянно растет, что объясняется как увеличением числа случаев инфицирования, так и совершенствованием способов диагностики данного заболевания.

Ротавирусы включают в семейство *Reoviridae*, род *Rotavirus*. Ротавирион представляет собой безоболочечный, сложноорганизованный, трехслойный капсид размером около 70 нм, который окружает геном, представленный 11 сегментами двуцепочечной РНК [2]. Шесть структурных и шесть неструктур-

ных белков закодированы в отдельных геномных сегментах, за исключением неструктурных белков 5 и 6 (NSP5 и NSP6), которые являются продуктами одного сегмента.

Род *Rotavirus* подразделяется на серологические группы А – F. Классификация основана на генотипическом и серологическом анализе. Главные группы определяют по группоспецифическому капсидному антигену VP6. Все эти группы инфицируют животных, но лишь группы А – С – человека. Следует отметить, что ротавирусы группы А являются наиболее распространенной причиной диарей у людей, поэтому их изучение особенно актуально.

Обычно ротавирусная инфекция проявляется в виде диареи (ротавирион изменяет функционирование эпителия тонкого кишечника), сопровождающейся рвотой, повышенной температурой, симпто-

мы длятся чаще всего 3 – 7 дней. По статистике, по сравнению с другими гастроэнтеритами ротавирусная инфекция чаще сопровождается дегидратацией организма [3].

Ввиду отсутствия препаратов с прямым противовирусным действием, лечение данного заболевания сводится к минимизации последствий дегидратации организма, которая может иметь критические последствия особенно для маленьких детей [4, 5].

Продолжительные исследования показали, что в результате естественно перенесенной ротавирусной инфекции образуется защита от возникновения тяжелой формы ротавирусного гастроэнтерита. Но тем не менее в течение жизни случаи ротавирусного гастроэнтерита могут повторяться. Иммуитет нестойкий, поэтому взрослые с низким уровнем антител могут болеть неоднократно. Невосприимчивость у переболевших обусловлена не только гуморальными, но и секреторными антителами.

Существующие в настоящее время вакцины для профилактики ротавирусной инфекции основаны на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, которые размножаются в кишечнике человека.

Использование вакцин на основе рекомбинантных белков имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с живыми вакцинами.

Цель работы – исследование иммуногенности двух созданных нами гибридных рекомбинантных белков – VP6VP8 и FliCVP6VP8, разработанных в качестве активных агентов кандидатной вакцины против ротавируса А [6]. Задачами исследования были получение высокоочищенных препаратов данных белков и изучение их антигенной активности.

Белок FliCVP6VP8 включает фрагменты белков VP6 и VP8 ротавируса А, а также компоненты флагеллина *Salmonella Typhimurium* FliC в качестве адъюванта, компоненты соединены гибкими мостиками. Белок VP6VP8 содержит все перечисленные элементы, за исключением компонентов флагеллина. Полипептид внутреннего капсида VP6 является мажорным белком вириона и обеспечивает защиту новорожденных животных за счет индукции выработки нейтрализующих секреторных антител. Выбранный фрагмент VP6 в составе гибридного белка имеет общие и гомологичные участки с фрагментом белка VP6 ротавируса С, а также гомологичные участки с фрагментом белка VP6 ротавируса В. Белок VP8-N-концевой триптический фрагмент белка VP4 – высокоиммуногенный полипептид, индуцирующий эффективную защиту против заболевания. Таким образом, представленные фрагменты являются консервативными частями белков VP6, VP8, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфические антитела, перекрестно реагирующие с гомологичными эпитопами различных штаммов ротавирусов А, В и С.

Использование эпитопов нескольких белков увеличивает эффективность вакцины, а использование гибких мостиков между эпитопами по-

зволяет сохранить правильную пространственную укладку белка и, соответственно, обеспечивает полноценное функционирование каждого эпитопа. Использование безопасного и высокоэффективного адъюванта на основе гибридного белка, содержащего фрагменты доменов FliC *Salmonella Typhimurium*, позволяет увеличить степень его иммуногенности.

Материалы и методы

Очистка гибридных рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8

Очистку гибридных рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 проводили путем последовательного применения иммобилизованной металлоаффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-НТУ-сефарозы (GE Healthcare, США) в денатурирующих условиях и гель-фильтрации в нативных условиях. Связывание с сорбентом Ni-НТУ сефарозой происходит за счет 6 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка [7].

Индукцированные клетки-продуценты лизировали с помощью 5 циклов соникации по 30 сек с двухминутным перерывом на льду. Затем проводили в течение часа разрушение телец включения путем инкубации с буфером (500 мМ натрий-фосфатный буфер, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). Колонка, содержащая Ni-НТУ-сефарозу, предварительно уравнивалась буфером для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 10 мМ имидазол). Разрушенные тельца включения наносили на колонку. Далее промывали колонку двумя объемами буфера для нанесения. После этого промывали колонку тремя объемами буфера для промывки (500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 30 мМ имидазол). Элюировали белок с помощью 5 мл буфера для элюции (500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0, 8 М мочевины, 500 мМ хлористый натрий, 200 мМ имидазол). Собирали фракции по 1 мл.

Для доочистки белков VP6VP8 и FliCVP6VP8, а также перевода их из денатурирующих условий в нативные использовали гель-фильтрацию. Данный метод не только позволяет разделять молекулы по их размеру, но и обеспечивает формирование правильной пространственной структуры рекомбинантных белков [8].

Хроматографию проводили на гель-фильтрационной колонке XK26/60 с сорбентом Superdex S-100, при скорости элюции 1,3 мл/мин, элюент – 0,01 М натрий фосфатный буфер, рН 7,2 – 7,4. Результаты анализировали с помощью электрофореза в 12,5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Леммли [9], гели окрашивали Кумасси G-250.

Изучение антигенной активности рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8

В экспериментах использовали самок мышей линии Balb/c 9 – 12-недельного возраста, кото-

рых содержали в стандартном виварии. Для проверки антигенной активности белков мышей линии Balb/c иммунизировали подкожно (FliCVP6VP8 вводили два раза с двухнедельным интервалом и VP6VP8 – три раза с двухнедельными интервалами). Для иммунизации 20 мкг белка и 0,4 мг гидроксида алюминия растворяли в физиологическом растворе до конечного объема 100 мкл и вводили испытуемому животному. В качестве контроля использовали интактных животных, содержащихся в тех же условиях. Животных разделили на 3 группы: 1 группа (15 мышей) – мышей иммунизировали белком FliCVP6VP8, 2 группа (15 мышей) – белком VP6VP8, 3 группа (контроль) – интактные животные (12 мышей). Животные умерщвлялись путем декапитации с помощью гильотины. Работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [10].

Титр антител у испытуемых животных определяли с помощью иммуоферментного анализа (ИФА). 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью покрывали целевым антигеном (гибридным рекомбинантным белком VP6VP8) в концентрации 3 мкг/мл (в 0,01 М натрий фосфатном буфере, pH 7,2 – 7,4), выдерживали ночь при +4 °С. Отмывали 3 раза 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2 – 7,4; 0,1% Tween 20. В лунки планшета добавляли 100 мкл 2-х кратных разведений сывороток (начиная с 1:200) в блокирующем буфере (0,01 М натрий фосфатный буфер, pH = 7,2 – 7,4, 5% бычий сывороточный альбумин), инкубировали 2 часа на шейкере при комнатной температуре. Отмывали 3 раза 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2 – 7,4; 0,1% Tween 20. Далее вносили в лунки по 100 мкл конъюгата – моноклональные крысиные антимышиные IgG в разведении 1:1000, меченные пероксидазой хрена. Инкубировали 1 час при комнатной температуре на шейкере. Отмывали 3 раза 0,01 М натрий-фосфатным буфером pH 7,2 – 7,4; 0,1% Tween 20. Далее вносили в лунки по 100 мкл субстрата – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Инкубировали 15 минут, затем реакцию останавливали 5% H₂SO₄. Учет реакции проводили при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность по крайней мере, в 2 раза большую, чем сыворотка неиммунизированных мышей в том же разведении.

Статистический анализ полученных результатов

Статистический анализ полученных результатов осуществляли с помощью компьютерной программы Microsoft Excel. При определении титра антител доверительный интервал рассчитывали для среднего по генеральной совокупности. Доверительный интервал – это интервал с обеих сторон от среднего выборки. Уровень значимости (альфа), используемый в расчетах, был равным 0,05, то есть уровень надежности равнялся 95%. Доверительный интервал рассчитывали по формуле: $\bar{x} \pm 1,96 \times (S/\sqrt{n})$, где \bar{x} – среднее по генеральной совокупности, n – объем выборки, S – стандартное отклонение для генеральной совокупности.

Стандартное отклонение – это мера того, насколько широко разбросаны точки данных относительно их среднего. Стандартное отклонение (S) рассчитывали по формуле:

$$\sqrt{\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

где n – объем выборки, x – отдельное значение.

Компьютерные методы анализа данных

Анализ полиакриламидных гелей проводили с помощью программы ImageJ.

Результаты и обсуждение

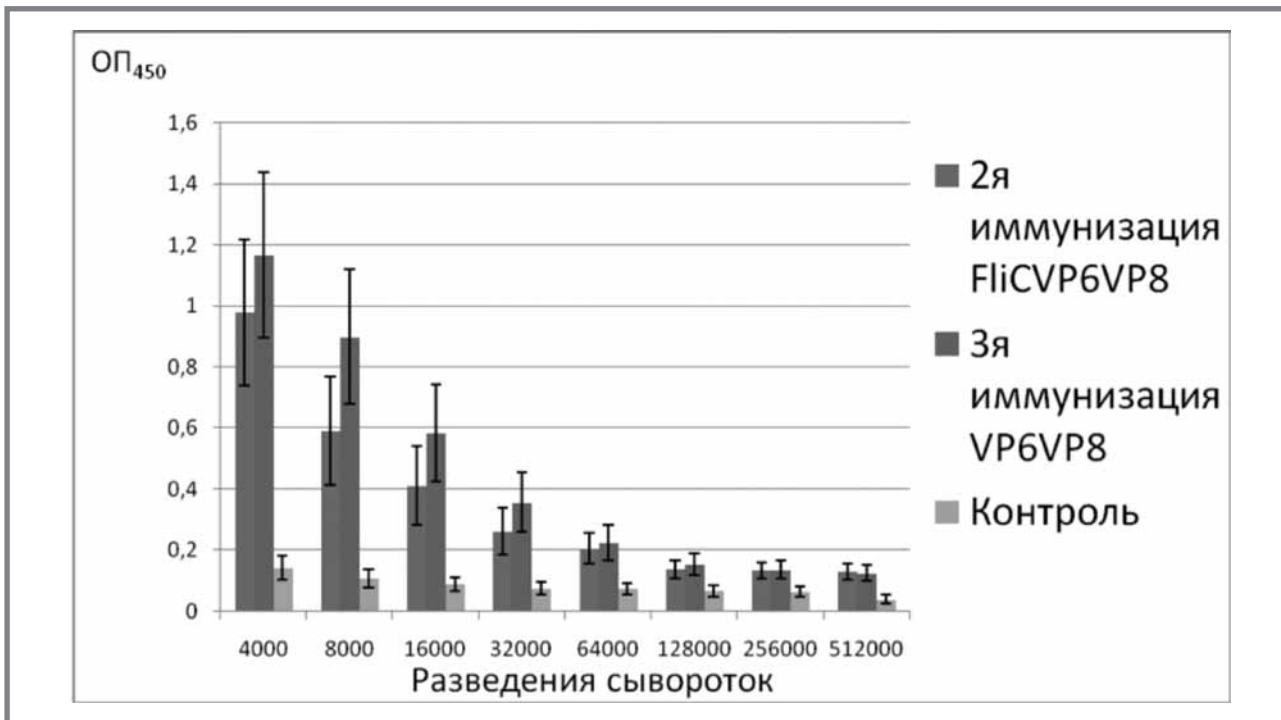
Получены высокоочищенные препараты смоделированных гибридных рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 методом последовательного применения иммобилизованной металлоаффинной хроматографии в денатурирующих условиях и гель-фильтрации в нативных условиях, позволяющих получать белок VP6VP8 с чистотой 98% и FliCVP6VP8 – 97%.

Антигенные свойства белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 изучали путем иммунизации самок мышей линии Balb/c и последующей оценки титра антител на вводимые белки. Проанализировав сыворотки, отобранные у одного животного из каждой группы через 2 недели после первого введения рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8, выяснили, что титр антител не отличался от контроля (интактные животные).

Через 2 недели после второго введения гибридных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 были получены и проанализированы сыворотки трех животных из каждой группы. Показали, что после второго введения рекомбинантных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 титр антител существенно отличался от контроля. После второго введения белка FliCVP6VP8 титр составил 1:102400, белка VP6VP8 – 1:25600. Было принято решение провести иммунизацию опытных животных соответствующей группы рекомбинантным белком VP6VP8 еще и третий раз.

Далее оценили титр антител, образовавшийся после третьего введения гибридного рекомбинантного белка VP6VP8. Собрали сыворотки у 11 животных через 2 недели после третьего введения иммуногена и проанализировали с помощью ИФА. Также проанализировали 11 сывороток животных, иммунизированных двукратно с интервалом в 2 недели гибридным рекомбинантным белком FliCVP6VP8. В результате данного эксперимента выяснили, что титр антител к гибриднему белку VP6VP8 после его трехкратного введения равен 1:128000, такой же титр антител был и после двукратного введения иммуногена FliCVP6VP8 (рис. 1).

Таким образом, на лабораторных животных показана способность формирования сильного специфического иммунного ответа на введение

Рисунок 1.
Диаграмма титра антител сывороток иммунизированных животных после введения гибридных рекомбинантных белков: после второго введения FliCVP6VP8 и после третьего введения VP6VP8


гибридных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8.

Профилактика возникновения тяжелой формы ротавирусной инфекции является актуальной проблемой современной медицины. Большинство детей инфицируется ротавирусами до достижения 5-летнего возраста. Ротавирусный гастроэнтерит является причиной тяжелого обезвоживания организма, что особенно опасно для новорожденных и маленьких детей и в ряде случаев может привести к смерти. Вследствие отсутствия препаратов с прямым противоротавирусным действием лечение ротавирусной инфекции сводится лишь к минимизации последствий дегидратации, которая для детского организма может быть критической.

В настоящее время в мире лицензированы две профилактические противоротавирусные живые вакцины – Rotarix (GSK, Бельгия) и RotaTeq (Merck, США). Rotarix содержит живой аттенуированный штамм ротавируса человека (RV1). В основе вакцины RotaTeq лежит реассортант ротавирусов человека и крупного рогатого скота (RV5) [11]. В России рекомендована к применению лишь вакцина RotaTeq. Хотя постлицензионные исследования иммунизации младенцев из группы риска в Европе показали отсутствие серьезных осложнений (таких как инвагинация кишечника), однако регистрируются различные побочные нежелательные явления после введения вакцин [12].

Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и аттенуированного. Также выбранные участки белков не несут функций природных белков ротавирусов и,

соответственно, не вызывают побочных эффектов, характерных для вакцин, полученных с использованием ротавирусов. Вакцинные препараты, получаемые с помощью технологии рекомбинантной ДНК, обладают большей фармацевтической чистотой (отсутствуют аллергены), чем вирионы, выращенные в куриных эмбрионах, и не содержат консервантов (формальдегид, мертиолят). Технология получения рекомбинантных белков с использованием клеток бактерий позволяет в короткие сроки (2 – 3 дня) на меньших площадях (ферментеры небольшого объема) при меньших технических ресурсах произвести аналогичное или большее количество вакцинных доз по сравнению с культивированием живого вируса.

Таким образом, рекомбинантные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 обладают иммуногенностью у мышей линии Balb/c, вызывая формирование высокого титра специфических антител в сыворотке крови при подкожном введении. Белок FliCVP6VP8 вызывал образование высокого титра антител (1:128000) уже после второй иммунизации. Такие результаты были ожидаемы, поскольку компонент гибридного рекомбинантного белка FliCVP6VP8 FliC состоит из участков флагеллина – FliC1 и FliC2, которые использовались в данной работе в качестве адъюванта. На данный момент флагеллин является одним из наиболее перспективных и хорошо изученных адъювантов нового поколения.

Первые работы, описывающие адъювантную активность флагеллина, появились также в конце 90-х годов прошлого века [13]. Эти исследования показали, что гетерологичные пептидные последо-

вательности могут быть включены во флагеллин для создания вакцинных препаратов, эффективных в отсутствие классических адъювантов. Поразительной особенностью данных препаратов было то, что возникающий иммунный ответ к флагеллину не снижал эффективности вакцин в формировании защитного ответа. За последнее десятилетие появилось множество работ, демонстрирующих адъювантные свойства флагеллина в контексте создания рекомбинантных вакцин [14].

Флагеллин обладает рядом свойств, которые делают привлекательным его использование в качестве потенциального адъюванта при создании вакцин для человека. Он эффективен в малых дозах (1 – 10 мкг в случае нечеловекообразных приматов) [15], не вызывает выработку IgE, возникающий иммунный ответ к самому флагеллину не снижает его адъювантной активности [16], в случае слитых белков последовательность антигена может быть присоединена как с N-, так и с C-конца (как в случае гибридного белка FliCVP6VP8) флагеллина: в экспериментах с кроликами он не вызывал токсичности при двукратном интраназальном или внутримышечном введении [17], а также он может быть быстро наработан в больших количествах с помощью биотехнологических подходов.

Данное исследование свидетельствует о том, что полученные гибридные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 являются высокоиммуногенными. Для выработки высокого титра антител на белок VP6VP8 требуется его трехкратное введение с ин-

тервалом в две недели, тогда как в случае гибридного белка FliCVP6VP8 достаточно двух введений гибридного белка. Такая разница обусловлена использованием в составе гибридного рекомбинантного белка FliCVP6VP8 адъюванта – компонентов флагеллина. Полученный нами результат еще раз подтверждает мощные адъювантные свойства рекомбинантного флагеллина при введении его в составе иммуногена.

Выводы

1. Изучена иммуногенность гибридных белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 на лабораторных животных.
2. Получены высокоочищенные препараты белков VP6VP8 и FliCVP6VP8 путем последовательного применения иммобилизованной металлоаффинной хроматографии в денатурирующих условиях и гель-фильтрации в нативных условиях. Изучены антигенные свойства полученных белков.
3. Рекомбинантные белки VP6VP8 и FliCVP6VP8 обладают иммуногенностью у мышей линии Balb/c, вызывая формирование высокого титра специфических антител (1:128000) в сыворотке крови при подкожном введении.

Полученные данные обуславливают целесообразность дальнейшего изучения иммуногенных свойств полученных гибридных рекомбинантных белков для создания на их основе кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции. ■

Литература

1. Shaw A.R. The rotavirus saga revisited. *Ann. Rev. Med.* 2013; 64: 165 – 174.
2. Schnagl R.D., Holmes I.H. Characteristics of the genome of human infantile enteritis virus (Rotavirus). *J. Virol.* 1976; 19 (1): 267 – 270.
3. Rodriguez W.J., Kim H.W., Arrobio J.O., Brandt C.D., Chanock R.M., Kapikian A.Z. et al. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. *J. Pediatr.* 1977; 91 (2): 188 – 193.
4. Dennehy P.H. Treatment and prevention of rotavirus infection in children. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2013; 15 (3): 242 – 250.
5. Parashar U.D., Nelson E.A.S., Kang G. Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *BMJ.* 2013; 347: 29 – 34.
6. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А. Создание гибридных рекомбинантных белков на основе VP6 и VP8 ротавируса человека группы А. *Инфекция и иммунитет.* 2014; 4: 229 – 234.
7. Invitrogen. Ni-NTA purification system. User manual. Cat. Nos K950-01 K951-01 K952-01 K953-01 K954-01 R901-01 R901-10 R 901-15. 2006: 32.
8. Li M., Su Z.-G., Janson J.-C. *In vitro* protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr. Purif.* 2004; 33 (1): 1 – 10.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259): 680 – 685.
10. Министерство здравоохранения СССР. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных; 1977: 755.
11. Dennehy P.H. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21 (1): 198 – 208.
12. Bruijning-Verhagen P., Mangen M.J., Felderhof M., Hartwig N.G., van Houten M., Winkel L. et al. Targeted rotavirus vaccination of high-risk infants; a low cost and highly cost-effective alternative to universal vaccination. *BMC Med.* 2013; 11: 112.
13. Ben-Yedidia T., Arnon R. Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine. *Immunol. Lett.* 1998; 64 (1): 9 – 15.
14. Balaram R., Kien P.K., Ismail A. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and *Salmonella* infections. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM.* 2009; 299 (3): 177 – 185.
15. Weimer E.T., Ervin S.E., Wozniak D.J., Mizel S.B. Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine.* 2009; 27 (48): 6762 – 6769.
16. Honko A.N., Sriranganathan N., Lees C.J., Mizel S.B. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2006; 74 (2): 1113 – 1120.
17. Mizel S.B., Bates J.T. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 2010; 185 (10): 5677 – 5682.

References

1. Shaw A.R. The rotavirus saga revisited. *Ann. Rev. Med.* 2013; 64: 165 – 174.
2. Schnagl R.D., Holmes I.H. Characteristics of the genome of human infantile enteritis virus (Rotavirus). *J. Virol.* 1976; 19 (1): 267 – 270.
3. Rodriguez W.J., Kim H.W., Arrobio J.O., Brandt C.D., Chanock R.M., Kapikian A.Z. et al. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. *J. Pediatr.* 1977; 91 (2): 188 – 193.
4. Dennehy P.H. Treatment and prevention of rotavirus infection in children. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2013; 15 (3): 242 – 250.
5. Parashar U.D., Nelson E.A.S., Kang G. Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *BMJ.* 2013; 347: 29 – 34.
6. Dukhovlinov I.V., Bogomolova E.G., Fedorova E.A., Simbirtsev A. S. Development of fusion recombinant proteins based on VP6 and VP8 of human rotavirus A. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2014; 4 (3): 229 – 234 (in Russian).
7. Invitrogen. Ni-NTA purification system. User manual. Cat. Nos K950-01 K951-01 K952-01 K953-01 K954-01 R901-01 R901-10 R 901-15. 2006: 32.
8. Li M., Su Z.-G., Janson J.-C. *In vitro* protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr. Purif.* 2004; 33 (1): 1 – 10.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259): 680 – 685.

10. The Ministry of Health of the USSR. Rules of work with experimental animals: 755. 1977 (in Russian).
11. Dennehy P.H. Rotavirus vaccines: an overview. Clin. Microbiol. Rev. 2008; 21 (1): 198 – 208.
12. Bruijning-Verhagen P., Mangen M.J., Felderhof M., Hartwig N.G., van Houten M., Winkel L. et al. Targeted rotavirus vaccination of high-risk infants; a low cost and highly cost-effective alternative to universal vaccination. BMC Med. 2013; 11: 112.
13. Ben-Yedidia T., Arnon R. Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine. Immunol. Lett. 1998; 64 (1): 9 – 15.
14. Balaram P., Kien P.K., Ismail A. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and *Salmonella* infections. Int. J. Med. Microbiol. IJMM. 2009; 299 (3): 177 – 185.
15. Weimer E.T. Ervin S.E., Wozniak D.J., Mizel S.B. Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine. 2009; 27 (48): 6762 – 6769.
16. Honko A.N., Sriranganathan N., Lees C.J., Mizel S.B. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 2006; 74 (2): 1113 – 1120.
17. Mizel S.B., Bates J.T. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2010; 185 (10): 5677 – 5682.

Рекомендации по вакцинации детей с сахарным диабетом*

М.П. Костинов (vaccinums@gmail.com), А.А. Тарасова

ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАН, Москва

Резюме

Освещены особенности вакцинации детей с сахарным диабетом. Показано, каким образом схема иммунизации может быть изменена в зависимости от патологии и возраста ребенка.

Ключевые слова: иммунизация, дети с сахарным диабетом

Vaccination of Children with Diabeet

M.P. Kostinov (vaccinums@gmail.com), A.A. Tarasova

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera of Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract

Recommendations highlighted features vaccination of children with diabeet. It is shown how the immunization scheme may be changed according to the pathology and the age of the child.

Key words: immunization, children with diabeet

Сочетанная вакцинация против пневмококковой инфекции и гриппа

Сочетанная вакцинация против пневмококковой инфекции и гриппа приводит к снижению респираторной заболеваемости у детей с СД 1-го типа в течение года после иммунизации по сравнению с аналогичным периодом до вакцинации в 1,7 раза. Число часто болеющих детей (6 раз в год и более) уменьшилось в 10 раз. Среднее число декомпенсаций СД по разным причинам в течение периодов сравнения уменьшилось в 2,3 раза. Заболеваемость гриппом снизилась с 13,1 до 5,2 на 100 человек в течение двух сопряженных сезонов [1].

Особенности формирования специфического иммунитета у детей с сахарным диабетом

Длительность сохранения поствакцинальных антител у детей и взрослых с диабетом изучена недостаточно. Некоторые авторы рекомендуют через 5 или 10 лет после стандартного курса провести дополнительную вакцинацию, однако сроки проведения серологических исследований с введением дополнительных доз вакцины или использование других схем вакцинации пациентов с СД 1-го и 2-го типов не изучены. В связи с этим в настоящее время

проводить дополнительную вакцинацию против гепатита В не рекомендуется, за исключением случаев повышенного риска заражения. Например, при наличии сопутствующей почечной патологии (особенно при хронической почечной недостаточности) после проведенного серологического обследования вакцинацию проводят по той же схеме, что у пациентов с хронической патологией почек.

Принимая во внимание низкие титры антител при наличии у детей трех и более осложнений СД, необходимо проводить серологический мониторинг с последующей ревакцинацией серонегативных, несмотря на отсутствие данных об инфицировании гепатитом пациентов с сахарным диабетом на фоне низких концентраций анти-HBs (< 10 мМЕ/мл).

Изучение длительности поствакцинального иммунитета к коклюшу показало, что число детей с высокими титрами антител с возрастом увеливалось, что может объясняться ростом числа перенесенного коклюша привитыми в силу снижения поствакцинального иммунитета и быть основанием для дополнительной вакцинации против коклюша в подростковом возрасте.

Окончание на странице 99

*Продолжение. Начало в №№ 5 (78), 6 (79), 1 (80).