

Доклиническое исследование токсичности и безопасности кандидатной живой коклюшной вакцины интраназального применения

Л. Н. Синяшина, Е. Г. Сёмин, А. Ю. Медкова, Р. А. Сюндюкова, Г. И. Каратаев

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России

Резюме

По данным Всемирной организации здравоохранения, на фоне массовой парентеральной иммунизации населения современными вакцинами во многих странах регистрируется рост заболеваемости коклюшем, в том числе среди подростков и взрослых. Увеличивается число трудно диагностируемых случаев коклюша – атипичных форм и бессимптомного бактерионосительства. Снижается эффективность современных коклюшных вакцин в связи с появлением «новых» штаммов *B. pertussis*. Сложившаяся эпидемиологическая картина требует создания новых, более эффективных вакцин и совершенствования методов и схем вакцинации. Наиболее перспективными для решения поставленных задач являются живые коклюшные вакцины, сконструированные с использованием современных методов генетической инженерии. Целью настоящего исследования является изучение токсичности и безопасности инновационной рекомбинантной живой коклюшной вакцины интраназального применения в экспериментах на животных. Представленные результаты демонстрируют отсутствие острой, специфической токсичности и безопасность интраназального применения кандидатной вакцины.

Ключевые слова: живая коклюшная вакцина, интраназальное применение, токсичность, выживаемость, вирулентность

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Синяшина Л. Н., Сёмин Е. Г., Медкова А. Ю. и др. Доклиническое исследование токсичности и безопасности кандидатной живой коклюшной вакцины интраназального применения. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2018; 17 (6): 98–108. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-98-108>

Pre-Clinical Toxicity Study and Safety Assessment of Candidate Live Pertussis Vaccine for Intranasal Administration

L. N. Sinyashina, E. G. Semin, A. Yu. Medkova, R. A. Siundiukova, G. I. Karataev

Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Health Ministry of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract

Against the backdrop of mass parenteral immunization by present pertussis vaccines the incidence rate of pertussis is recorded in many countries, as well as among adolescents and adults, according to the World Health Organisation data. The number of cases of pertussis complicated to detect is increased, meaning atypical forms and inapparent bacteria carrying. In the presence of appearance of *Bordetella pertussis* strains of «new» genotype the efficacy of current pertussis vaccines is decreased. Existing epidemiologic situation cries out for development of new, more efficient pertussis vaccines and improvement of immunization methods and schedules. The most promising for this problem solution are live pertussis vaccines, constructed with genetic engineering methods.

The goal of present research is studying of toxicity and safety of innovative recombinant live pertussis vaccine for intranasal administration in animals.

Obtained results demonstrate the absence of specific toxicity of candidate vaccine and its use safety in intranasal applying.

Key words: live pertussis vaccine, intranasal administration, toxicity, survival, virulence

Конфликт интересов не заявлен.

For citation: Sinyashina L. N., Semin E. G., Medkova A. Yu. et al. Pre-Clinical Toxicity Study and Safety Assessment of Candidate Live Pertussis Vaccine for Intranasal Administration. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2018; 17 (6): 98–108 (In Russ.) <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-98-108>

* Для переписки: Геннадий Иванович Каратаев – д. б. н., ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории генетики бактерий НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, РФ; 123098; г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел. +7 (499) 193-61-90. karataevgi@rambler.ru. © Синяшина Л. Н. и др.

* For correspondence: Gennadij I. Karataev – Dr. Sci. (Biol.), leading researcher associate, head laboratory of genetics of bacteria, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Healthcare Ministry of the Russian Federation, Moscow, Russia. karataevgi@rambler.ru. © Sinyashina L. N. et al.

Введение

Коклюш – тяжёлое респираторное инфекционное заболевание, до введения с начала 1950 годов массовой иммунизации цельноклеточной коклюшной вакциной (ЦКВ) сопровождалось высокой детской смертностью. В 1990 годах в ряде экономически развитых стран, ЦКВ заменили на менее реактогенные бесклеточные коклюшные вакцины (БКВ). По данным ВОЗ, на фоне массовой парентеральной иммунизации населения современными вакцинами (ЦКВ и БКВ) ежегодно в мире погибают более 450 тыс. детей в возрасте до одного года. Смертность от коклюша младенцев до 6 месяцев в странах Африки достигает 10–15% [1]. Растёт заболеваемость подростков и взрослых [2–4]. Увеличивается число трудно диагностируемых случаев коклюша из-за атипичных форм и бессимптомного бактерионосительства. Снижается эффективность современных коклюшных вакцин в связи с появлением изменённых новых штаммов *B. pertussis*, способных преодолевать коллективный иммунитет [5, 6].

До недавнего времени большинство исследований по определению иммунного ответа к бактериям *B. pertussis*, было сосредоточено на факторах, связанных с выработкой специфических антител. В настоящее время всё больше данных указывают на ведущую роль клеточного иммунитета в предотвращении первичного инфицирования бактериями *B. pertussis*. Исследования показали, что длительную защиту после перенесенного заболевания обеспечивает клеточный иммунитет. Постинфекционный иммунитет продолжительностью до 15 лет связывают с индукцией клеток памяти – Т-хелперов 1 типа (Th1) и 17 типа (Th17). При этом противокклюшные иммуноглобулины в крови определяются в течение двух–трёх лет [1, 3]. После иммунизации ЦКВ и БКВ специфические антитела в диагностически значимых титрах также выявляются не более 1–3 лет [1, 3]. При этом рядом исследователей показано, что вакцинация ЦКВ формирует более напряженный клеточный иммунный ответ за счет хелперов 1-го типа, что обеспечивает лучшую защиту от инфицирования *B. pertussis* по сравнению с БКВ, при иммунизации которой развивается гуморальный ответ, индуцируемый Т-хелперами 2-го типа (Th2) [1, 7]. Формирование клеточного противобактерийного постинфекционного иммунного ответа подтвердили результаты экспериментального инфицирования обезьян вида павиан анубис [7, 8], гамадрил и макака резус вирулентными бактериями *B. pertussis* [9, 10]. После вакцинации обезьян ЦКВ также наблюдалось некоторое ускорение элиминации вирулентных бактерий *B. pertussis*, тогда как иммунизация БКВ на этот процесс не влияла [8, 11, 12].

Таким образом, недостаточная эффективность современных БКВ и ЦКВ создает условия, при которых происходит изменение антигенной структуры бактерий *B. pertussis*, позволяющей возбудителю

ускользнуть от поствакцинального иммунного ответа. Такая ситуация диктует необходимость разработки новых эффективных и безопасных препаратов для профилактики коклюша у младенцев и для ревакцинации подростков и взрослых.

Наиболее перспективным представляется создание живой коклюшной вакцины для интраназального применения, способной имитировать естественное инфицирование *B. pertussis* без проявления клинических и лабораторных признаков заболевания и вызывать защитную реакцию организма, схожую с таковой после перенесенного заболевания.

Нами, в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, на основе штаммов, используемых для производства ЦКВ в России, сконструированы аттенуированные бактерии *B. pertussis* 4MKs, продуцирующие нетоксичную форму коклюшного токсина (основного протективного антигена) и не синтезирующие дермoneкротический токсин. На основе этих бактерий создан препарат кандидатной рекомбинантной живой коклюшной вакцины (РЖКВ) для интраназального применения [13, 14].

Цель исследования – изучение токсичности и безопасности экспериментальных серий препарата кандидатной рекомбинантной живой коклюшной вакцины (РЖКВ).

Материалы и методы

Изучение токсичности и безопасности препарата РЖКВ проводили в рамках программы доклинического исследования по Государственному контракту № 13411.1008799.13.152 на НИОКР «Доклинические исследования живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша» Шифр «2.1 Вакцина коклюш 2013» по теме: «Доклинические исследования живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша» в соответствии с требованиями Минздрава России.

Животные. Инбредные мыши линии Balb/c и C57 BL/6 весом 12–16 г; новорожденные аутбредные мышата и крысы; морские свинки весом 150 г; кролики породы шиншилла весом 1,0–1,5 кг.

Острую токсичность РЖКВ определяли на двухнедельных мышатах и крысах в соответствии со стандартными методиками (А. Н. Миронов, 2012 [15]). На базе лицензированного для осуществления доклинических исследований АНО «ИМБИИТ» проводили: наблюдение за поведением животных; общий и биохимический анализ крови; измерение веса тела и отдельных органов; патоморфологическое изучение состояния внутренних органов. Препарат вводили однократно в максимально возможных дозах: мышатам интраназально 10^{10} м. к. (10 МЕ – 10 предполагаемых иммунизирующих доз для человека) и внутривентрально – 2×10^{10} м. к. (20 иммунизирующих доз); крысам обоими способами введения в одинаковой дозе – $2,5 \times 10^{10}$ м. к.

Подготовка препарата и суспензии. Лиофилизат препарат РЖКВ серии 1.1.11 (2×10^{11} МЕ) непосредственно перед введением суспендировали в 200 мкл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида при комнатной температуре, перемешивали до получения однородной взвеси. Субстанцию готовили суспендированием в 0,9% растворе натрия хлорида 18–20 часовой культуры бактерий, собранных с чашки Петри. Суспензию доводили до нужной однородности и мутности по стандарту (ОСО 42-28-85-2014). Препарат в нужных концентрациях, с учётом возможного объёма, вводили однократно интраназально и внутрибрюшинно: мышатам интраназально 10^{10} м. к. – 10 МЕ и внутрибрюшинно – 2×10^{10} м. к. – 20 МЕ; крысам по $2,5 \times 10^{10}$ м. к. – 25 МЕ обоими путями введения. Интраназально, без наркоза препарат вводили шприцем типа Гамильтон 200 мкл в объёме 10–15 мкл – мышатам и (20–30) мкл – крысам. Взрослым мышам вводили 25–30 мкл препарата интраназально после наркоза. Для краткосрочного наркоза, обеспечивающего свободное дыхание животного, внутримышечно вводили раствор «Золетила» (Франция) в количестве 0,2–0,4 мг. Каплю суспензии на конце иглы шприца Гамильтон (20–25 мкл) подносили к носу мыши (крысы) добиваясь её полного вдыхания без разбрызгивания.

Лейкоцитозстимулирующую (ЛСА), гистаминсенсibilизирующую (ГСА) активности и весовую токсичность препаратов определяли в соответствии со стандартными методиками при внутрибрюшинном и интраназальном введении взрослым мышам [8]. Интраназально в объёме 25 мкл, внутрибрюшинно по 0,5 мл (10 МЕ).

Активность дермoneкротического токсина (ДНА) определяли при внутрикожном введении кроликам и морским свинкам по 0,2 мл РЖКВ – 4 МЕ (МУК 4.2.2317-080).

Аллергизирующую активность препарата РЖКВ определяли в тестах конъюнктивальной пробы и активной кожной анафилаксии на морских свинках [15].

Оценку сенсibilизирующих свойств РЖКВ проводили с помощью теста Овери – определение «немедленной анафилактической реакции кожи» в нашей модификации (замена парентерального способа введения препарата на интраназальный). Морских свинок трёхкратно интраназально сенсibilизировали РЖКВ, содержащим 10 МЕ в 100 мкл суспензии. Через 20 дней внутрикожного вводили 100 мкл вакцины в дозе 10 и 2 МЕ и через 20 минут внутрисердечно краситель синего Эванса. После эвтаназии свинок эфиром измеряли размер окрашенного пятна на внутренней поверхности кожи в месте введения препарата. Использовали морских свинок весом 250–300 г. Контролем служили свинки, которым препарат для сенсibilизации организма не вводили. Опытных свинок сенсibilизировали трёхкратным введением 0,5 мл раствора, содержащего

0,5 мкг овальбумина (Sigma, США) и 0,5 мг гидроксида алюминия или трёхкратным интраназальным введением препаратом РЖКВ. Через 10 дней животным закапывали в правый глаз по 50 мкл препарата РЖКВ (10 вакцинных доз), а в левый – 30 мкл 0,9% раствора натрия хлорида pH 6,8–7,2 и наблюдали за состоянием конъюнктивы глаз. Критерием аллергической реакции было наличие расширения сосудов конъюнктивы правого глаза кролика в сравнении с левым – контрольным.

Статистическая обработка результатов. Средние значения измеряемых величин и их стандартные отклонения вычисляли с использованием программы *Microsoft Excel 2007*. Достоверность различия сравниваемых средних значений определяли по критерию Стьюдента [4].

Результаты и обсуждение

1. Исследование острой токсичности РЖКВ на двухнедельных мышатах и крысках

Препарат РЖКВ предполагается применять для вакцинации младенцев и ревакцинации подростков и взрослых, в связи с этим исследование острой токсичности препарата и субстанции – живые аттенуированные бактерии *B. pertussis* 4MKS, проводили на двухнедельных мышатах и крысках.

Субстанцию вводили в максимально возможной дозе, исходя из веса и возраста животных: интраназально – 10^{10} м. к. (10 МЕ), внутрибрюшинно – 2×10^{10} м. к. (20 МЕ), крысам обоими способами – $2,5 \times 10^{10}$ м. к. (25 МЕ). Препарат РЖКВ вводили только интраназально, поскольку в его состав, помимо субстанции, в качестве стабилизаторов входят желатин и сахароза, действие которых на неполовозрелых животных при внутрибрюшинном введении не описано.

Токсичность препарата РЖКВ и субстанции исследовали общепринятыми методами, определяя: показатели токсичности; клинические и биохимические показатели крови; морфометрическую и гистологическую оценку внутренних органов и тканей [15].

Изучение поведения, динамики изменения веса мышат и крыс при интраназальном и внутрибрюшинном введении субстанции и интраназальном введении РЖКВ в указанных дозах не зарегистрировало отклонений в сравнении с контролем.

Результаты измерения относительной массы внутренних органов (масса органа/масса тела $\times 100\%$) через 24 ч после введения РЖКВ выявили незначительное уменьшение веса тимуса и селезёнки после введения субстанции в дозе 20 МЕ (табл. 1).

Через 7 суток отклонение от массы этих органов было статистически недостоверным по отношению к контрольной группе. В экспериментах с крысами (доза РЖКВ 25 МЕ) отклонений относительной массы внутренних органов зарегистрировано не было. Гистологическое исследование внутренних органов мышат и крыс не выявило

Таблица 1.
Средние показатели групповой относительной массы внутренних органов мышат в процентах, через 24 часа
Table 1. Average values of the group relative mass of the internal organs of mice in percentage, after 24 hours

Органы Organs	Контроль Control	Интраназальное введение субстанции Intranasal administration of the substance	Внутрибрюшинное введение субстанции Intraperitoneal administration of the substance		Интраназальное введение РЖКВ Intranasal administration of recombinant live pertussis vaccine
	–	10 ME	15 ME	20 ME	10 ME
Печень Liver	4,08 ± 0,058	3,98 ± 0,142	4,24 ± 0,220	4,75 ± 0,388	4,10 ± 0,084
Почки Kidney	1,41 ± 0,053	1,44 ± 0,038	1,38 ± 0,034	1,54 ± 0,110	1,41 ± 0,019
Селезенка Spleen	0,53 ± 0,016	0,50 ± 0,018	0,49 ± 0,019	0,41 ± 0,040*	0,49 ± 0,020
Сердце Heart	0,57 ± 0,010	0,58 ± 0,018	0,61 ± 0,042	0,53 ± 0,022	0,56 ± 0,015
Тимус Thymus	0,61 ± 0,018	0,61 ± 0,029	0,55 ± 0,023	0,53 ± 0,056*	0,55 ± 0,013
Легкие Lungs	1,42 ± 0,006	1,39 ± 0,052	1,60 ± 0,104	1,59 ± 0,125	1,45 ± 0,042

Примечание: *Различие в сравнении с контролем значимо по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).
Note: *Difference in comparison with the control is significant according to Student's t test ($p < 0.05$).

какой-либо патологии внутренних органов и тканей животных.

Измерения клинических и биохимических параметров крови проведены у контрольных и вакцинированных крысят. Вакцинация не повлияла на показатели клинического анализа, активности ферментов и количества билирубина (табл. 2 и 3). Показатели углеводного, липидного, белкового и водно-солевого обмена вакцинированных крысят также были в пределах нормы (данные не представлены).

2. Изучение местно-раздражающего действия препарата РЖКВ

О местном раздражающем действии препарата РЖКВ судили по результатам макроскопического и гистологического исследования носовых ходов у крысят при интраназальном введении и у мышат при подкожном введении. На гистологических препаратах не было отмечено полнокровия, гиперплазии или некроза эпителия, а также увеличения количества бокаловидных клеток и других морфологических изменений. При подкожном введении мышатам РЖКВ макроскопическое и гистологическое исследования также не выявили патологических изменений в месте введения.

Исследование специфической токсичности препарата РЖКВ

а) Определение лейкоцитозстимулирующей активности (ЛСА). ЛСА препарата РЖКВ определяли после интраназального введения в дозе 10^{10} м. к. (10 ME). В качестве препарата сравнения

использовали коммерческий препарат АКДС вакцины серии 252/ААП/15, который вводили внутримышечно. Результаты сравнительного определения ЛСА при использовании мышей линии Balb/C представлены в таблице 4.

Из таблицы видно, что абсолютные значения количества лейкоцитов у контрольных мышей находились в допустимом для эксперимента диапазоне, уровень лейкоцитов достоверно ниже у мышей, инокулированных интраназально или внутрибрюшинно РЖКВ, по сравнению с животными, которым внутрибрюшинно была введена вакцина АКДС. Субстанция также не проявляла ЛСА при обоих способах введения.

б) Определение гистаминсенсibilизирующей активности (ГСА). Для сравнительного определения ГСА РЖКВ использовали отраслевой стандартный образец – ОСО-5 (42-28-87-02П) и АКДС вакцину серии 252/ААП/15 в соответствии с МУК (4.2.2317-080). Гибели мышей, иммунизированных РЖКВ, после введения разрешающей дозы гистамина сульфатдигидрохлорида (2,5 мг на мышь) не было. При этом значения индексов ГСА для препаратов ОСО-5 и АКДС имели дозозависимый характер, что и позволило считать эксперимент проведенным корректно (табл. 5).

Изучение дермонекротической активности показала полное отсутствие некротических изменений кожи кролика при исследовании трёх серий препарата РЖКВ и двух серий субстанции. На рисунке 1 видно, что через 72 ч после внутрикожного введения 0,2 мл (2 ME, 1 ME, 0,5 ME) одной из серий РЖКВ кожный покров оставался без изменений,

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

Таблица 2.
Показатели клинического анализа крови крысят после интраназального и внутрибрюшинного введения препарата кандидатной РЖКВ
Table 2. Indicators of clinical analysis of blood of rats after intranasal and intraperitoneal administration of the drug candidate recombinant live pertussis vaccine

Сутки после введения Day after administration	Контрольная группа Control group	Интраназальное введение субстанции Intranasal substance administration	Внутрибрюшинное введение субстанции Intraperitoneal administration of the substance	Интраназальное введение РЖКВ Intranasal administration of recombinant live pertussis vaccine
Эритроциты Red blood cells (RBC), 10 ¹² /л				
Фоновое значение Background value	3,7 ± 0,10	3,8 ± 0,17	3,6 ± 0,14	3,8 ± 0,14
1	3,9 ± 0,08	3,9 ± 0,05	3,8 ± 0,19	3,7 ± 0,08
7	5,2 ± 0,05	5,0 ± 0,09	5,1 ± 0,12	4,7 ± 0,102
Тромбоциты Platelets (PLT), 10 ⁹ /л				
Фон Background	553,0 ± 30,61	530,8±27,21	522,5±45,48	509,5 ± 63,14
1	604,0 ± 80,57	503,8±19,51	521,3 ± 58,37	548,5 ± 42,19
7	545,5 ± 36,12	556,8±46,35	653,5 ± 100,35	646,8 ± 89,26
Гематокрит Hematocrit (HCT), %				
Фон Background	25,4 ± 0,10	26,8±1,19	25,4 ± 0,63	25,6 ± 0,77
1	25,6 ± 0,94	24,2±0,41	23,9 ± 0,81	24,7 ± 0,51
7	31,2 ± 1,34	32,3 ± 1,94	31,4 ± 0,89	29,7 ± 2,35
Гемоглобин Hemoglobin (HGB), г/л				
Фон Background	100,0 ± 3,03	97,9 ± 1,72	99,4 ± 4,53	102,0 ± 3,70
1	100,3 ± 2,87	97,0 ± 5,80	93,3 ± 6,36	95,5 ± 0,50
7	120,3 ± 3,40	117,3 ± 2,46	117,3 ± 2,84	118,8 ± 4,48
Лейкоциты White blood cells (WBC), 10 ⁹ /л				
Фон Background	6,7 ± 0,50	6,0 ± 0,60	6,2 ± 0,43	6,2 ± 0,37
1	5,4 ± 0,70	5,5 ± 0,33	5,4 ± 0,73	8,2 ± 1,35
7	7,6 ± 0,58	8,8 ± 0,82	8,1 ± 1,46	6,6 ± 1,73
Лимфоциты Lymphocytes (LYM), %				
Фон Background	72,4 ± 1,42	72,4 ± 1,64	71,1 ± 0,86	72,0 ± 2,33
1	72,2 ± 2,30	69,9 ± 2,01	67,6 ± 3,18	65,5 ± 3,96
7	74,1 ± 0,26	72,1 ± 1,38	72,9 ± 1,17	72,5 ± 0,71
Моноциты Monocytes (MID), %				
Фон Background	10,8 ± 0,63	11,9 ± 2,05	10,3 ± 1,05	10,7 ± 1,36
1	10,3 ± 1,10	10,2 ± 0,55	12,5 ± 1,61	11,5 ± 1,00
7	9,9 ± 0,30	10,9 ± 0,95	10,6 ± 1,22	10,9 ± 0,86

Сутки после введения Day after administration	Контрольная группа Control group	Интраназальное введение субстанции Intranasal substance administration	Внутрибрюшинное введение субстанции Intraperitoneal administration of the substance	Интраназальное введение РЖКВ Intranasal administration of recombinant live pertussis vaccine
Гранулоциты Granulocytes (GRAN), %				
Фон Background	16,9 ± 1,54	15,7 ± 1,26	18,7 ± 0,42	17,3 ± 1,63
1	18,0 ± 1,65	19,9 ± 1,53	19,9 ± 4,70	23,0 ± 3,08
7	16,1 ± 0,23	17,0 ± 0,46	16,5 ± 1,52	16,6 ± 0,52

Таблица 3.
Средние показатели активности ферментов и содержания билирубина крови у крысят после интраназального и внутрибрюшинного введения препарата кандидатной РЖКВ и субстанции
Table 3. The average activity of enzymes and the content of blood bilirubin in rats after intranasal and intraperitoneal administration of the drug candidate recombinant live pertussis vaccine and substance

Сутки после введения Day after administration	Контроль Control group	Интраназальное введение субстанции Intraperitoneal administration of the substance	Внутрибрюшинное введение субстанции Intraperitoneal administration of the substance	Интраназальное введение РЖКВ Intranasal administration of recombinant live pertussis vaccine
АЛТ, Е/л Alanine aminotransferase, E/l				
1	47,0 ± 3,67	47,2 ± 0,21	44,5 ± 4,60	45,9 ± 5,98
7	43,4 ± 5,66	48,2 ± 5,03	43,8 ± 3,58	42,6 ± 3,50
АСТ, Е/л Aspartate aminotransferase, E/l				
1	158,0 ± 12,84	190,6 ± 12,43	181,1 ± 26,83	161,4 ± 9,42
7	167,0 ± 6,45	176,6 ± 4,76	162,8 ± 26,49	156,9 ± 9,45
Щелочная фосфатаза, Е/л Alkaline phosphatase, E/l				
1	787,1 ± 84,75	817,5 ± 59,52	852,3 ± 42,07	713,0 ± 55,12
7	802,3 ± 64,04	885,5 ± 68,84	868,3 ± 92,63	851,9 ± 66,09
Общий билирубин, мкмоль/л Total bilirubin, μM/l				
1	1,1 ± 0,09	1,1 ± 0,103	1,0 ± 0,11	1,0 ± 0,08
7	1,2 ± 0,10	1,2 ± 0,10	1,1 ± 0,12	1,1 ± 0,07

не было какого либо покраснения или уплотнения, в то время как при внутрикожном введении микробной суспензии изогенного вирулентного штамма *B. pertussis* 475 в концентрации 1 МЕ и в том же объеме наблюдали выраженный некроз размером около 20 мм, характерный для нативных бактерий возбудителя коклюша.

Изучение специфической токсичности препарата РЖКВ в тесте определения массы тела мышей (МТМ)

При интраназальном и внутрибрюшинном введениях в дозе 10 МЕ статистически зарегистрировано относительное увеличение массы тела животных. Прирост массы тела вакцинированных

мышей/прирост массы тела контрольных мышей х 100 был равен 102 и 66% при интраназальном и внутрибрюшинном введении соответственно. Прирост МТМ у мышей, инокулированных внутрибрюшинно субстанцией (без стабилизатора), составил 98%, а внутрибрюшинное введение стабилизатора приводило к снижению МТМ (табл. 6).

Изучение алергизирующей активности препарата РЖКВ

После трёхкратного интраназального и внутрикожного введения морским свинкам и последующего внутривенного введения красителя Эванса (синего) характерных реакций сенсибилизации выявлено не было. В месте введения на внутренней

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

Таблица 4.
Лейкоцитозстимулирующая активность РЖКВ при интраназальном и внутрибрюшинном введениях мышам Balb/c
Table 4. Leukocytosis-stimulating activity of recombinant live pertussis vaccine (RLPV) and substance with intranasal and intraperitoneal injections into mice Balb/c

Препарат Drug	Доза Dose	№ ¹⁾	Способ введения Mode of administration	Количество лейкоцитов через 72 часа The number of leukocytes after 72 hours
РЖКВ серия 1.1.11 RLPV series 1.1.11	10 ME	10	интраназально intranasally	9700 ± 900
РЖКВ серия 1.1.11 RLPV series 1.1.11	10 MOE	10	внутрибрюшинно intraperitoneally	12700 ± 1000
Вакцина АКДС серия 252/ААП/15 DPT vaccine series 252/ ААП/15	10 ME	10	внутрибрюшинно intraperitoneally	21700 ± 2800
0,85% р-р solution NaCl	0,5 мл ml	5	интраназально intranasally	7990 ± 1151
0,85% р-р solution NaCl	25 мкл mkl	5	внутрибрюшинно intraperitoneally	6840 ± 737

Примечание: 1) Количество мышей в эксперименте.
Note: 1)The number of mice in the experiment

Таблица 5.
Гистаминсенсibiliзирующая активность РЖКВ при интраназальном и внутрибрюшинном введении мышам линии C57 BL/6
Table 5. Histamine sensitizing activity of recombinant live pertussis vaccine with intranasal and intraperitoneal administration to mice C57 BL/6

Препарат Drug	Доза Dose (м.к. x 10 ⁹)	N ₀ ¹⁾	Способ введения Mode of administration	Гибель мышей Death of mice		N _с ²⁾	N _п ³⁾	% Death of mice	ГСД ₅₀ HSF ₅₀ (м. к. x 10 ⁹)
				2 ч h	24 ч h				
РЖКВ серия 1.1.11 RLPV series 1.1.11	10,0	10	интраназально intranasally	0	0	10	0	0	нр
	2,0	10		0	0	10	0	0	
	0,4	10		0	0	10	0	0	
РЖКВ серия 1.1.11 RLPV series 1.1.11	10,0	10	внутрибрюшинно intraperitoneally	0	0	9	1	10	нр
	2,0	10		0	0	10	0	0	
	0,4	10		0	0	10	0	0	
ОСО-5	10,0	10	внутрибрюшинно intraperitoneally	8	0	2	8	80	2,1
	2,0	10		6	0	4	6	60	
	0,4	10		0	0	10	0	0	
АКДС DPT vaccine	10,0	10	внутрибрюшинно intraperitoneally	8	0	2	8	80	2,7
	2,0	10		6	0	4	6	60	
	0,4	10		2	0	8	2	20	
Контроль Control	0,9% NaCl	10	внутрибрюшинно intraperitoneally	0	0	0	0	0	–
Контроль Control	0,9% NaCl	10	интраназально intranasally	0	0	0	0	0	–

Примечание: 1)количество мышей в опыте; 2)количество выживших мышей; 3)количество погибших мышей
Note: 1) the number of mice in the experiment; 2) the number of surviving mice; 3) the number of dead mice

поверхности кожи морских свинок размер окрашенного пятна не превышал 2 мм, так же, как и после введения физиологического раствора, что является подтверждением отсутствия немедленной анафилактической реакции. У морских свинок после местной аппликации препарата РЖКВ, так же как и у контрольных животных, не было зарегистрировано признаков сенсibiliзации конъюнктивы глаза.

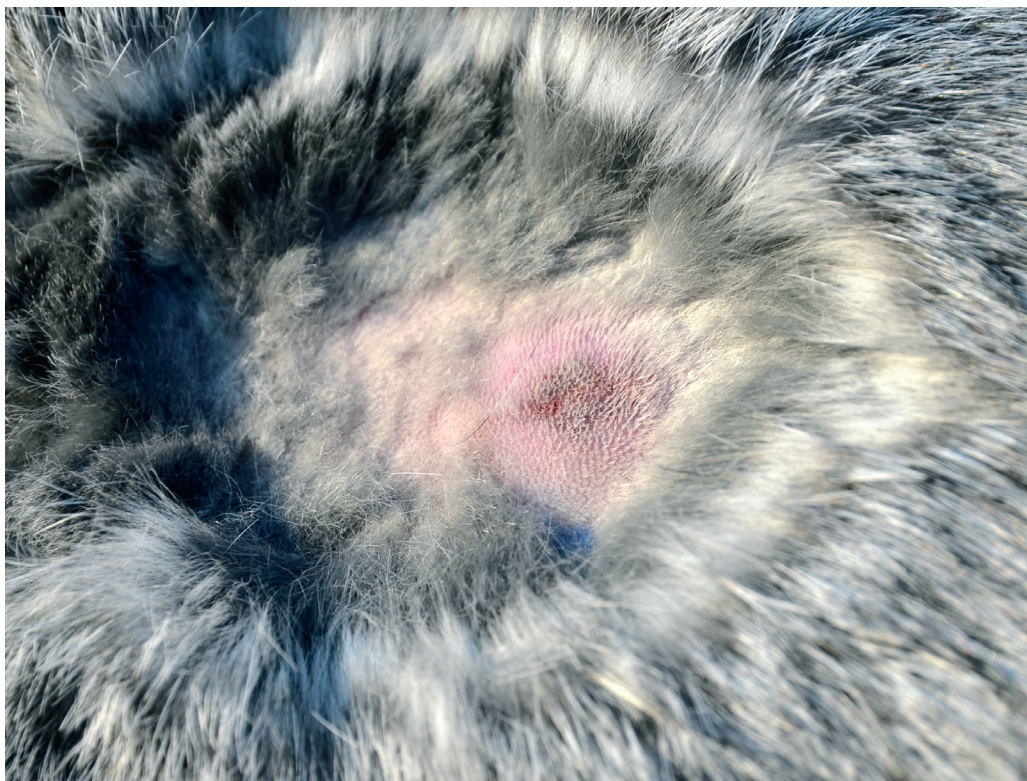
В современных условиях как наиболее перспективным, рассматривается создание эффективных коклюшных вакцин интраназального введения на базе живых аттенуированных бактерий *B. pertussis*. Такие вакцины в настоящее время разрабатывают ученые России и Франции [12, 14]. Особенно важно, что РЖКВ предполагается применять для первичной иммунизации младенцев, а также ревакцинации подростков и взрослых. В ФГБУ

Рисунок 1.

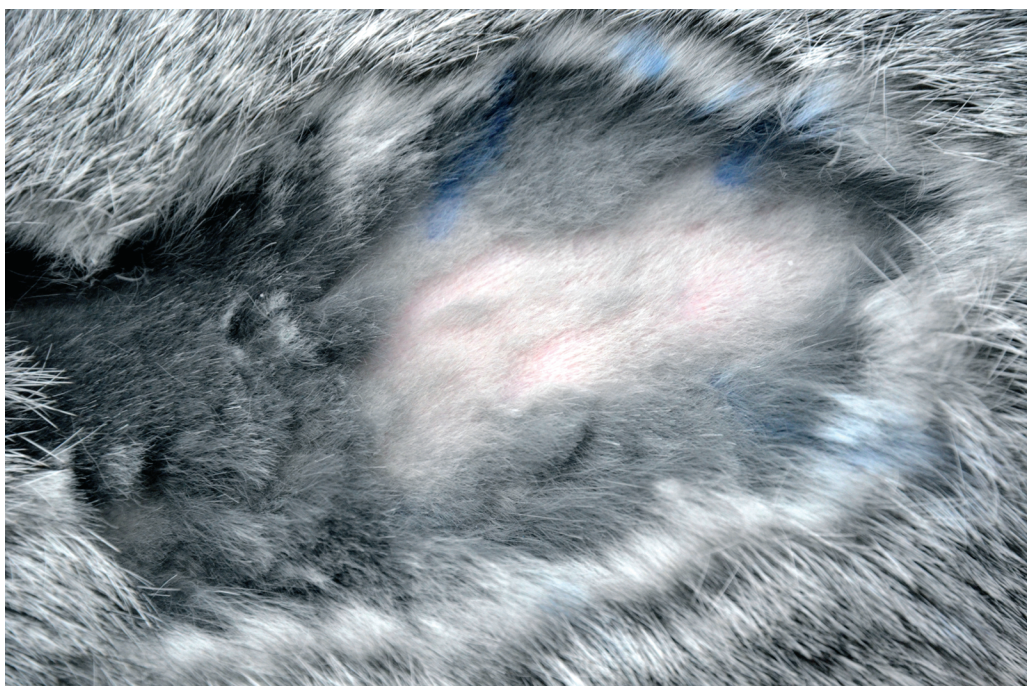
Исследование дермoneкротической активности препарата РЖКВ и субстанции при внутрикожном введении кроликам. Стрелками указаны места введения РЖКВ (а), и вирулентных бактерий *B. pertussis* 475 (б)

Figure 1. The study of the dermonekroticheskoy activity of the drug recombinant live pertussis vaccine (RLPV) and substance when administered intracutaneously to rabbits The arrows indicate the sites of administration of RLPV (a), and virulent bacteria *B. pertussis* 475 (b)

(a)



(б)



Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

Таблица 6.

Определение специфической токсичности препарата РЖКВ и субстанции в тесте изменения массы тела мышей (МТМ)

Table 6. Determination of the specific toxicity of the drug RLPV and substance in the test of changes in the body weight of mice (BWM)

Образец	Доза Dose ME	Способ введения Mode of administration	Групповая МТМ (г) Groups BWM (g)			Прирост МТМ (г) Growth BWM (g)	
			День введения Introduction day	Через 72 ч After 72 h	Через 7 суток After 7 days	Через 72 ч After 72 h	Через 7 суток After 7 days
Субстанция Substance	10	i/p	174,2	191,0	210,6	+ 16,0	+ 36,5
Субстанция Substance	10	i/n	163,3	179,3	199,8	+ 17,8	+ 46,4
РЖКВ серия 1.1.11 RLPV series 1.1.11	10	i/n	162,6	176,8	195,2	+ 14,2	+ 32,6
РЖКВ серия 1.1.11 RLPV series 1.1.11	10	i/p	161,3	173,5	187,5	+ 12,2	+ 24,8
Стабилизатор Stabilizer	0,5 мл	i/p	167,6	163,4	158,5	- 4,6	- 9,1
Контроль Control	Физ. р-р.	i/n	187,6	196,8	219,6	+ 9,2	+ 32,0
Контроль Control	Физ. р-р.	i/p	167,2	182,1	204,5	+4,9	+37,3

Примечание: В каждую группу входило по 10 мышей линии Balb/c: i/p – внутрибрюшинное введение 0,5 мл препарата; i/n – интраназальное введение 25 мкл.

«НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России на основе генетически аттенуированных бактерий *B. pertussis* создан лиофилизированный препарат кандидатной рекомбинантной живой коклюшной вакцины (РЖКВ) для интраназального применения [13, 14]. Доклиническое изучение токсичности РЖКВ на неполовозрелых мышатах и крысах показало, что препарат не вызывает патологических изменений органов новорожденных животных при введении дозы препарата, в 10–25 раз превышающей дозу, предназначенную для иммунизации людей. Снижение веса тимуса и селезенки у вакцинированных мышат, зарегистрированное через сутки после введения, нивелировалось и на 7-й день наблюдения масса органов была такой же, как у контрольных животных. При гистологическом исследовании этих органов каких-либо отклонений не выявлено. К тому же при повторных экспериментах на мышатах из другого помёта снижения веса тимуса и селезенки выявлено не было. У крыс во все сроки наблюдения уменьшения веса тимуса не наблюдали, что также подтвердило безопасность РЖКВ.

Отсутствие токсичности препарата РЖКВ также подтверждали результаты клинических и биохимических анализов крови иммунизированных мышат

и крыс, не выявившие каких-либо отклонений от контрольных показателей.

Препарат РЖКВ при интраназальном введении не оказывал местного раздражающего и системного аллергизирующего действия, что говорит о его гипоаллергенности.

Аналогичные результаты были получены нами на экспериментальной модели обезьян макака резус. В носоглотке обезьян после однократной и двукратной инокуляции препарата РЖКВ не было зарегистрировано каких-либо отклонений от нормы. Не было зарегистрировано и изменения количества IgE в сыворотке крови обезьян, что также свидетельствовало об отсутствии системного аллергизирующего действия РЖКВ интраназального применения (результаты не опубликованы).

Исследования специфической токсичности РЖКВ, проведенные по стандартной для коклюшных вакцин схеме, не выявили специфической для вирулентных бактерий *B. pertussis* токсичности КТ – ЛСА, ГСА и активности дермoneкротического токсина, что доказало полноценность аттенуации и стабильность модификации вирулентных бактерий *B. pertussis* 475, являющихся родительским штаммом для конструирования аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS. Изучена генетическая

и структурная стабильность аттенуированных бактерий *B. pertussis* [13, 14].

Изменение массы тела мышей после введения тестируемого препарата является важной характеристикой его токсичности. Согласно национальным стандартам коклюшная вакцина считается безвредной, если относительный прирост МТМ мышей равен 70% или более от прироста МТМ контрольной группы. При интраназальном введении мышам РЖКВ прирост МТМ был выше по сравнению с контрольными животными. Измеренные показатели при интраназальном и внутрибрюшинном введении субстанции (аттенуированные бактерии *B. pertussis* 4МКС) также были существенно выше, чем у контрольных мышей, что указывало на отсутствие токсичности исследуемого препарата.

Относительный прирост веса мышей при внутрибрюшинном введении РЖКВ составил 66%, что несколько меньше контрольных значений. Задержка увеличения веса мышей после внутрибрюшинного введения РЖКВ связана, скорее всего, с присутствием в препарате сахарозы и желатина, разрешённых к медицинскому применению без каких-либо ограничений, но не охарактеризованных в тесте весовой токсичности. Действительно, наши эксперименты показали, что внутрибрюшинное введение мышам стабилизатора (смесь сахарозы и желатина) приводит к снижению веса животных. То есть, некоторое отступление параметра весовой токсичности при внутрибрюшинном введении РЖКВ взрослым мышам от принятой для АКДС нормы связано, вероятно, с присутствием в нём сахарозы и/или желатина. Интересно отметить, что внутрибрюшинное введение стабилизатора неполовозрелым мышатам в значительно меньших

дозах приводило не только к задержке их роста, но и к гибели части животных. При этом не было зарегистрировано видимых нарушений в структуре внутренних органов мышат.

Таким образом, в рекомендуемых для доклинического изучения тестах препарат кандидатной РЖКВ был не токсичен и безопасен.

Выводы

1. Однократное интраназальное и внутрибрюшинное введение препарата кандидатной РЖКВ в 25-кратной дозе ($2,5 \times 10^{10}$ м. к.), предполагаемой для иммунизации людей, не вызывало гибели животных и признаков интоксикации.
2. Однократное интраназальное введение препарата кандидатной РЖКВ в 10-кратной дозе для человека не приводило к гибели животных, так же как и внутрибрюшинное введение 20-кратной иммунизирующей дозы.
3. Препарат кандидатной РЖКВ при интраназальном введении не проявлял местнораздражающего и алергизирующего действия.
4. Исследование клинических и биохимических показателей крови, морфометрическая и гистологическая оценка внутренних органов и тканей мышат и крысят через одни сутки и 7 дней после введения препарата кандидатной РЖКВ обоими способами не вызывали каких-либо патологических изменений.
5. Доклинические исследования препарата кандидатной РЖКВ интраназального применения продемонстрировали безопасность и отсутствие токсичности. Препарат РЖКВ может быть рекомендован для дальнейшего клинического исследования на добровольцах.

Литература

1. Wolter N., Mupere E., Tan T., et al. Pertussis in Africa: Findings and recommendations of the Global Pertussis Initiative (GPI) // *Vaccine*. 2018. Vol. 36, N 18. P. 2385–2393.
2. Пименова А. С., Борисова О. Ю., Цвиркун О. В., и др. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции // *Инфекция и иммунитет*. 2017. Т. 7, № 2. С. 162–170.
3. The immunological basis for immunization series: module 4: pertussis (Immunological basis for immunization series; module 4). World Health Organization 2017. ISBN 978-92-4-151317-3. Доступно по: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259388/9789241513173-eng.pdf>. Ссылка активна на 1 марта 2018.
4. Бабаченко И. В. Коклюш у детей. С.-Петербург: Комментарий; 2014.
5. Борисова О. Ю., Мазурова И. К., Иващенко Г. А., и др. Особенности распространения штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем, с различными аллельными вариантами гена, кодирующего промотарную область коклюшного токсина (ptxP) // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2012. № 2. С. 28–34.
6. Mooi F.R. Bordetella pertussis and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen // *Infect. Genet. Evol.* 2010. Vol. 10, N 1. P. 36–49.
7. Warfel J.M., Merkel T.J. et al. Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 response and long-live Th17 and Th1 immune cells in nonhuman primates // *Mucosal Immunol.* 2013. Vol. 6, N 4. P. 787–796.
8. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. N 111. P. 787–792.
9. Карамаев Г. И., Синяшина Л. Н., Медкова А. Ю., и др. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis* // *Генетика*. 2016. Т. 52, № 4. С. 422–430.
10. Кубрава Д. Т., Медкова А. Ю., Синяшина Л. Н., и др. Экспериментальный коклюш у обезьян // *Вестник РАМН*. 2013. № 8. С. 28–33.
11. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J. Comparison of Three Whole-Cell Pertussis Vaccines in the Baboon Model of Pertussis // *Clin. Vaccine Immunol.* 2015. Vol. 23, N 1. P. 47–54.
12. Loch C., Papin J.F., Lecher S., et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *B. Pertussis* // *Disease and infection*. 2017. N 216. P.117.
13. Карамаев Г. И., Синяшина Л. Н. Аттенуированные бактерии *Bordetella pertussis* вакцина против возбудителя коклюша. Патент РФ на изобретение № 2455024 С1; 2012.
14. Сёмин Е. Г., Синяшина Л. Н., Медкова А. Ю., и др. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* геномной ptxP3 // *ЖМЭИ*. 2018. № 4. С. 33–41.
15. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунологические лекарственные препараты). Москва: Гриф и К; 2012.
16. Алексеева И. А. Микробиологический надзор за качеством коклюшного компонента комбинированных вакцин. Автореф. дис. д-ра мед. наук. Москва; 2015.

References

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

1. Wolter N, Mupere E, Tan T, et al. Pertussis in Africa: Findings and recommendations of the Global Pertussis Initiative (GPI). *Vaccine*. 2018; 36, 18: 2385–2393. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.03.025
2. Pimenova AS, Borisova OYu, Tsvircun OV, et al. Efficiency of application of molecular-genetic diagnostics in case of inspection of the schools of a whooping cough. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017; 7 (2): 162–170. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-162-170
3. The immunological basis for immunization series: module 4: pertussis (Immunological basis for immunization series; module 4). World Health Organization 2017. ISBN 978-92-4-151317-3. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259388/9789241513173-eng.pdf>. Accessed: 1 Mar 2018.
4. Bobachenko IV. Pertussis in children. Saint-Petersburg: Kommentariy; 2014 (In Russ.)
5. Borisova Olu, Mazurova IK, Ivashinnikova GA, et al. Characteristics of Bordetella pertussis strains isolated from pertussis patients in Moscow by using multilocus sequencing. *Epidemiol. and Infection Diseases*. Immunobiol. 2012; (2): 28–34. (In Russ.)
6. Mooi FR. Bordetella pertussis and vaccination: the persistence of a gene-tically monomorphic pathogen. *Infect. Genet. Evol.* 2010; 10 (1): 36–49.
7. Warfel JM, Merkel TJ, et al. Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 respons and long-live Th17 and Th1 immune cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol.* 2013; 6 (4): 787–796.
8. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111: 787–792.
9. Karataev GI, Sinyashina LN, Medkova AY, et al. Insertional inactivation of virulence operon in population of persistent Bordetella pertussis bacteria. *Russian journal of genetics*. 2016; 52 (4): 422–430. (In Russ.)
10. Kubrava DT, Medkova AY, Sinyashina LN, et al. Experimental whooping cough of nonhuman primate. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2013; 68 (8): 28–33. (In Russ.)
11. Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ. Comparison of Three Whole-Cell Pertussis Vaccines in the Baboon Model of Pertussis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 23 (1): 47–54. doi: 10.1128/CVI.00449-15
12. Loch C, Papin JF, Lecher S, et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against B. pertussis. *Disease and infection*. 2017; 216: 117.
13. Karataev GI, Sinyashina LN. Attenuirovannye bakterii Bordetella pertussis vaksina protiv vozbuditelya kokliusha. Patent RUS № 2455024 C1; 2012. (In Russ.)
14. Semin EG, Sinyashina LN, Medkova AY, et al. Construction of recombinant attenuated Bordetella pertussis bacteria of ptxP3 genotype. *J. of microbiol., epidemiol. and immunobiol.* 2018; 4: 33–41. (In Russ.)
15. Mironov AN. Manual on preclinical research of medicinal preparations (immunobiological medicinal preparations). Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ.)
16. Alekseeva IA. Mikrobiologicheskij nadzor za kachestvom kokliushnogo komponenta kombinirovannikh vaksinn [dissertation]. Moscow; 2015. (In Russ.)

Об авторах

- Людмила Николаевна Синяшина – д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098; Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел. +7 (499) 193-61-90. vasilissa7777@yandex.ru
- Евгений Григорьевич Сёмин – мл. научный сотрудник лаборатории генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098; г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел. +7 (499) 193-61-90. recitar@mail.ru
- Алиса Юрьевна Медкова – к. м. н., научный сотрудник лаборатории генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098; г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел. +7 (499) 193-61-90. baburida@yandex.ru
- Резида Анваровна Синдюкова – к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории генетики бактерий, НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, 123098; г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел. +7 (499) 193-61-90. densm@rambler.ru
- Геннадий Иванович Каратаев – д. б. н., ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, РФ; 123098; г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел. +7 (499) 193-61-90. karataevgi@rambler.ru

Поступила: 28.07.2018. Принята к печати: 14.11.2018.

About the Authors

- Lyudmila N. Sinyashina – Dr. Sci. (Med.), leading research associate, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. vasilissa7777@yandex.ru
- Evgenij G. Semin – junior research associate, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. recitar@mail.ru
- Alisa Yu. Medkova – Cand. Sci. (Med.), research associate, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. baburida@yandex.ru
- Rezida A. Sindukova – Cand. Sci. (Biol.), senior research associate, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. densm@rambler.ru
- Gennadij I. Karataev – Dr. Sci. (Biol.), leading researcher associate, head laboratory of genetics of bacteria, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Healthcare Ministry of the Russian Federation, Moscow, Russia. karataevgi@rambler.ru

Received: 28.07.2018. Accepted: 14.11.2018.

ИНФОРМАЦИЯ CDC

Охват рутинной вакцинацией в 2017 году

(Выдержки из публикации в MMWR 16 ноября, 2018; 67(45))

По данным ВОЗ, ЮНИСЕФ, общий охват тремя дозами вакцины АКДС увеличился с 79 (2007 г.) до 84% (2010 г.) и оставался стабильным с 2010 по 2017 г. (с 84 до 85%). Подобно охвату АКДС, общий охват первой дозой вакцины против кори вырос с 80 (2007 г.) до 84% (2010 г.) остается стабильным. Охват третьей дозой вакцины против полиомиелита оставался стабильным на уровне 84–85% с 2010 года. С 2007 по 2017 год общий охват второй дозой коревой вакциной увеличился с 33 до 67%, ротавирусной вакциной (от 2 до 28%), а также вакцинами: пневмококковой конъюгированной (с 4 до 44%), против краснухи (с 26 до 52%), от Haemophilus influenzae типа b) (с 25 до 72%) и против гепатита В) (при рождении: с 24 до 43% и тремя дозами: с 63 до 84%). Для достижения и поддержания высокого уровня охвата вакцинацией необходимы целенаправленные,

ориентированные на конкретную ситуацию стратегии, особенно в странах с наибольшим числом непривитых детей.

По охвату вакцинации лидирует Американский регион ВОЗ, за ним следуют по убывающей: Европейский, Юго-Восточной Азии, Восточного Средиземноморья и Африканский. В национальные календари прививок стран-членов ВОЗ включены вакцины КДС, полиомиелитная, коревая (100% стран), три дозы гепатитной, ХИБ (97% и 98% стран соответственно). Только 54% стран прививают новорожденных от гепатита В, 49% стран – от ротавирусной инфекции.

Подготовил Н. А. Озерецковский

Источник: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/wr/mm6745a2.htm>