

**ПОВЕРХНЕВІ АНТИГЕНИ ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ, ОДЕРЖАНІ ЗА ДОПОМОГОЮ ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ, ЯК БІОЛОГІЧНА ПЛАТФОРМА ДЛЯ РОЗРОБКИ КОМБІНОВАНОЇ ДИФТЕРІЙНОЇ КАНДИДАТ-ВАКЦИНИ**

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України» (м. Харків)

babych\_em@ukr.net

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Дана робота є фрагментом науково-дослідної роботи «Визначити вплив кашлюково-дифтерійних антигенів на клітинно-опосередкований імунітет та обґрунтувати концептуальні положення створення вакцин у форсуєчому режимі», № державної реєстрації 0117U002276.

**Вступ.** Дифтерійна інфекція у поточний час реєструється переважно у країнах, ендемічних по дифтерії. За даними ВООЗ, у 2017 р. про найбільшу кількість випадків дифтерії повідомлено з Нігерії (7616), Індії (5293), Індонезії (954), Венесуели (786), Непалу (728), Пакистану (560) [1]. В усіх вказаних країнах відзначається тенденція до росту захворюваності у порівнянні з 2016 р., особливо в Пакистані – у 46,7 рази та у Венесуелі – у 25,4 рази. В межах цих країн дифтерія залишається серйозною проблемою для суспільства та системи охорони здоров'я і являє собою, внаслідок інтенсивних міграційних процесів у сучасному світі, потенціальний ризик для країн, епідеміологічно благополучних щодо дифтерії [2].

В Україні захворюваність у останні роки перебувала на спорадичному рівні: у 2015 р. зареєстровано 2 випадки дифтерії, у 2016 р. – 4, у 2017 р. – 0 [1]. Рівень охоплення вакцинацією проти дифтерії після 2010 року суттєво зменшився: у 2016 р. одну вакцинацію проти дифтерії, правцю і кашлюку (КДП1) одержали 42 % дітей, триразово були щеплені 19 %; у 2017 р. ці показники дещо покращилися: КДП1 – 65 %, КДП3 – 50 % [3].

Останній епідемічний підйом дифтерії на території країн Східної Європи у 90-х роках минулого сторіччя проходив на тлі значних показників щепленості та високої частки вакцинованих серед захворівших, в тому числі: дітей – 74,7 %, підлітків – 86,6 %, дорослих – 43,6 %. На клінічно виражені та токсичні форми дифтерії хворіли навіть повноцінно щеплені особи. Були щепленими більшість захворівших із груп ризику (60 %) [4]. За період розвитку епідемії зареєстровано 690 летальних випадків від дифтерійної інфекції, серед яких щепленими були 196 дорослих (28,4 %) і 97 дітей (14,0 %). В 1996 р. цей показник серед померлих від дифтерії дорослих досягнув 35,5 %, причому 12,7 % з них були щеплені проти дифтерії тричі [5].

Дослідники дійшли висновку про відсутність впливу первинного щеплювального комплексу на рівень захворюваності на дифтерію у 90-х роках, що непрямым чином свідчить про його недостатню ефективність [4]. Результати серологічного моніторингу за станом колективного антитоксичного імунітету підтверджували дані епідеміологічного аналізу. Навіть після вакцинації та першої ревакцинації близько 20 % дітей, у яких сформувався імунітет до

правцю, не мали імунітету до дифтерії на захисному рівні, що може вказувати на недостатність імуногенності дифтерійного компоненту у АКДП-вакцині [4].

Зазначені епідеміологічні особливості підйому захворюваності, а також існування ендемічних по дифтерії територій поставили ряд запитань щодо ефективності вакцинопрофілактики цієї небезпечної інфекції та примушують вчених продовжувати пошуки шляхів її удосконалення [5-8].

Як відомо, сучасні специфічні профілактичні вакцинні препарати проти дифтерії представлені дифтерійним анатоксином у складі різних багатокомпонентних вакцин і спрямовані на стимулювання специфічного антитоксичного імунітету, що попереджує розвиток токсичних форм дифтерії, але не поширення інфекції, яке відбувається, особливо у поміж-епідемічний період, переважно за рахунок латентної циркуляції збудника через субклінічні форми дифтерійної інфекції та бактеріоносійство. Антитоксичний гуморальний імунітет реалізується за умови включення системи уродженого імунітету та активації Th1 ланки клітинного імунітету. Тригером включення уродженого захисту є бактеріальні антигени, що потрапляють на слизові оболонки макроорганізму та взаємодіють із Toll-подібними рецепторами дендритних клітин [9].

З точки зору сучасної імунологічної парадигми, клітини уродженого імунітету здатні утворювати «навчений імунітет», імунологічну пам'ять, подібну до тієї, котра притаманна набутому імунітету, що збільшує стійкість макроорганізму до реінфекції. Основою навченого імунітету є епігенетичні зміни експресії генів і клітинної фізіології уроджених імунних клітин (моноцитів/макрофагів, НК-клітин) внаслідок їх стимуляції інфекційними або неінфекційними агентами різного походження [10]. Ці універсальні механізми можна ефективно використовувати для розробки нових профілактичних і терапевтичних стратегій для захисту від множинних інфекційних захворювань [10,11]. Розробка вакцин нового покоління, котрі поєднують адаптивну та уроджену імунну пам'ять, нещодавно було запропоновано і у відношенні вакцин проти кашлюку [12]. Коринебактерії, неспецифічні імуномодулюючі властивості котрих давно відомі [13], вочевидь теж є індукторами навченого імунітету і можуть бути використані для удосконалення дифтерійної вакцини за рахунок уведення до її складу поверхневих антигенів мікробних клітин *C. diphtheriae*.

При існуючому різноманітті способів одержання мікробних антигенів використання фізичних методів привертає увагу перспективою налагодження випуску нативних, хімічно не змінених, і відповідно, більш специфічних вакцинних препаратів. Одним з таких

**Результати вивчення біохімічного складу антигенних препаратів *C. diphtheriae***

№№ зразків	Фізичний фактор	Біохімічний склад		
		Білок, мг/мл	Гліцерин-тейхоєва кислота, мкг/мл	Рибітол-тейхоєва кислота, мкг/мл
1	УЗО № 1	8,1	72,65	14,42
2	УЗО № 2	12,38	57,48	9,82
3	УЗО: № 1+№ 2+№ 3	20,0	197,48	41,62
4	ЕМВ НЗВЧ (1)	19,52	79,45	20,0
5	ЕМВ НЗВЧ (2)	22,38	131,16	19,37
6	ЕМВ НЗВЧ (1)+(2)	10,24	62,16	19,37
7	Лазер He-Ne № 1	23,81	100,11	23,25
8	Лазер He-Ne № 2	15,71	93,16	17,84
9	Лазер ТГц	16,66	88,22	11,05
10	Лазер He-Ne+лазер ТГц	11,52	67,48	10,07
11	УЗО+лазер He-Ne	13,33	258,66	113,12
12	УЗО+лазер ТГц	16,66	274,11	107,13
13	УЗО+ЕМВ НЗВЧ (1)	1,904	48,72	30,0
14	УЗО+ЕМВ НЗВЧ (2)	17,14	95,12	14,32
15	He-Ne № 1+ЕМВ НЗВЧ (1)	18,57	103,11	33,17
16	He-Ne № 2+ЕМВ НЗВЧ (2)	28,95	270,21	50,18

чинників, який давно використовується для дезінтеграції мікроорганізмів є ультразвукове опромінення [14]. Використовувався ультразвук і для дезінтеграції мікробної маси *C. diphtheriae* [13].

Суттєвим для збереження нативних характеристик поверхневих антигенів є вибір параметрів ультразвукового опромінення, його частоти, потужності, джерела ультразвуку, оскільки дезінтеграція потужними ультразвуковими хвилями призводить, навіть при охолодженні, до перегрівання матеріалу і, як наслідок, до неконтрольованої зміни просторової конфігурації білків, пошкодження тонкої структури поверхневих антигенів, знижуючи їх специфічність [15].

**Мета дослідження.** Розробка підходів до одержання поверхневих антигенів бактеріальних клітин *C. diphtheriae* як біологічної платформи для створення комбінованої вакцини проти дифтерії з бактеріальним компонентом за допомогою фізичних факторів.

**Об'єкт і методи дослідження.** Бактеріальні антигени одержували у такій послідовності: накопичували біомасу культури музейного штаму *C. diphtheriae*, var. *gravis*, tox+, інактивували її, відмивали від залишків живильного середовища, дезінтегрували фізичними чинниками в різних режимах та комбінаціях (ультразвук – УЗО, вузькосмугове електромагнітне випромінювання надзвичайно високої частоти – ЕМВ НЗВЧ, гелій-неоновий (He-Ne) та терагерцовий (ТГц) лазери), центрифугували, піддавали ультрафільтрації та гел-хроматографії з подальшою концентрацією антигенного препарату [16].

Експериментальні антигенні препарати *C. diphtheriae* оцінювали за їх біохімічним складом, ад'ювантними властивостями щодо нативного очищеного дифтерійного анатоксину за даними РПГА та специфічною безпечністю за шкірними реакціями при вакцинації лабораторних тварин (кролів).

Експериментальні дослідження було проведено з дотриманням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України

**Таблиця 1.** «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Застосування різних фізичних факторів та їх режимів показало, що за умови однакової оптичної щільності зразків вихідної мікробної суспензії ( $13,5 \times 10^9$  КУО/мл), вони мають власні характеристики впливу на поверхневі структури бактеріальних клітин коринебактерій. Біохімічні дослідження одержаних бактеріальних антигенних препаратів показали значне варіювання вмісту білку та тейхоєвих кислот (**табл. 1**).

З даних **табл. 1** очевидно, що найбільші показники концентрації білку у препаратах – від 22,4 до 28,9 мг/мл – виявилися при застосуванні гелій-неонового лазера, ЕМВ НЗВЧ (2) та їх комбінації. Щодо тейхоєвих кислот, які є складовими клітинної стінки грампозитивних бактерій та вважаються адгезинами, найбільші концентрації гліцерин-тейхоєвої кислоти знайдено у препаратах, виготовлених під дією УЗО+лазер ТГц (274, 1 мкг/мл), лазера He-Ne, ЕМВ НЗВЧ 42,2 ГГц (270,21 мкг/мл), УЗО+лазер He-Ne (258,66 мкг/мл). Поєднання дії ультразвуку і лазерів ТГц або He-Ne дало максимальний вихід рибітол-тейхоєвої кислоти – 107,1 та 113,1 мкг/мл, відповідно.

Взагалі треба відзначити значні коливання вмісту усіх вказаних речовин у досліджуваних антигенних препаратах: по білку – максимум у 9,2 рази, для тейхоєвих кислот – у 5,6 рази (ГТК) та у 11,5 рази (РТК). Для досліджуваних антигенних препаратів знайдено прямий кореляційний зв'язок середньої сили поміж виходом білку та суми тейхоєвих кислот ( $r = 0,664$ ).

В ході подальших досліджень для дезінтеграції мікробної маси використовувалося ультразвукове опромінення (УЗО) завдяки можливості залучення різних приладів-джерел ультразвуку, у тому числі промислових, з бажаними технічними характеристиками і регулюванням режимів опромінення.

Стандартизація режимів УЗО середньої частоти та низької потужності показала можливість впливу на вміст білку в антигенному препараті при варіюванні вихідної оптичної щільності мікробної суспензії та тривалості дії УЗО [17]. Так, якщо оптична щільність мікробної суспензії *C. diphtheriae* становила 1 McF (за шкалою Мак-Фарланд), то концентрація білку складала 0,24 мг/мл. Підвищення оптичної щільності втричі дало вихід білку у препараті у 7,7 разів більший – 1,85 мг/мл, а оптична щільність 15 McF дала можливість підвищити концентрацію білку майже у 52 рази – 12,38 мг/мл.

Варіювання режимів опромінення ультразвуком дало можливість встановити оптимальну тривалість дії УЗО для заданих параметрів ультразвуку. Максимальні значення концентрації білку було зареєстровано на четвертій та сьомій годині УЗО, а саме: 2,38 мг/мл.

Виявилось також, що послідовна ступінчаста ультразвукова дезінтеграція мікробної суспензії збудника дифтерії дозволяє суттєво підвищити кон-

Таблиця 2.

**Динаміка рівня гуморального імунітету проти дифтерії в сироватках крові кролів після їх вакцинації досліджуваними антигенними препаратами**

№№ пп	Антигенні препарати	Рівень антитоксинів, МО/мл			
		7 днів	14 днів	21 день	28 днів
К	НОДА (20 Lf)	0	0	0	0
1	ВДВ	1,5	0,7	0,35	0,5
2	ДЗ	0,125	0,06	16,0	0,03
3	КС	0	0,03	0	0
4	БА	0	0,125	0,06	0
5	БА (1:2000)	0	0,03	0	0

центрацію білку у антигенному препараті за рахунок використання другого семигодинного циклу УЗО біомаси збудника: темпи приросту концентрації білку на цьому етапі склали 50,6 %. Третій цикл УЗО біомаси дозволив одержати антигенний безклітинний препарат з концентрацією 1,51 мг/мл. На 4-5-му циклах вихід білку суттєво зменшився – до 0,86 та 0,66 мг/мл.

Антигенні властивості досліджуваних препаратів вивчалися при підшкірній вакцинації кролів, яким вводили, відповідно, 1,0 мл нативного очищеного дифтерійного анатоксину (НОДА), вбиту формаліном цілюноклітинну дифтерійну вакцину (ВДВ), мікробний УЗО-дезінтеграт (ДЗ), препарат клітинних стінок збудника дифтерії (КС), бактеріальний антиген (БА), що містить розчинні поверхневі антигени. Середні показники щотижневого рівня титрів антитоксичного дифтерійного імунітету в сироватках крові вакцинованих кролів впродовж місяця після підшкірного щеплення представлені у таблиці (табл. 2).

Як виявилось, щеплення кролів препаратом очищеного концентрованого дифтерійного анатоксину в дозі 20 Lf не призвело до формування антитоксичного гуморального імунітету. Підшкірне введення кролям препаратів бактеріальних антигенів *S. diphtheriae* стимулювало утворення антитоксичних антитіл. Вбита формаліном цілюноклітинна дифтерійна вакцина, як найбільш повноцінний в антигенному відношенні препарат, вже через тиждень після щеплення призвела до появи антитоксинів – 1,5 МО/мл, рівень яких впродовж місяця поступово знизився до 0,5 МО/мл.

Введення мікробного УЗО-дезінтеграту істотно підвищило утворення антитоксинів – на третьому тижні титр антитіл збільшився від початкового 0,03 до 16,0 МО/мл, але в подальшому різко впав.

Застосування препаратів клітинних стінок та цілюноклітинного або розведеного (1:2000) розчинного поверхневого бактеріального антигену дезінтегрованих мікробних клітин дифтерії призводило до епізодичної (одно- дворазової) появи невисоких титрів антитоксичних антитіл – від 0,03 до 0,125 МО/мл (табл. 2).

Результати визначення ад'ювантних властивостей досліджуваних препаратів субклітинних комплексів в комбінації з НОДА за даними РПГА наведені у таблиці 3. За контроль був взятий нативний очищений дифтерійний анатоксин в дозі 20 Lf.

Найбільші титри протидифтерійних антитоксинів показала комбінація дезінтеграту мікробних клітин *S. diphtheriae*, розведеного 1:1000, з дифтерійним анатоксином: к третьому-четвертому тижню резуль-

Таблиця 3.

**Динаміка рівня дифтерійного гуморального імунітету в сироватках крові кролів після їх імунізації бактеріальними антигенними препаратами *S. diphtheriae***

№№ пп	Антигенні препарати	Рівень антитоксинів, МО/мл			
		7 днів	14 днів	21 день	28 днів
К	Контроль (НОДА)	0	0	0	0
1	НОДА + ДЗ (1:1000)	0	0,5	16,0	16,0
2	НОДА + КС	0	0,5	1,0	0,25
3	НОДА + БА (1:2)	0,5	4,0	2,0	2,0
4	НОДА + БА (1:2000)	0	0,03	0	0,03

тати РПГА досягли високого рівню – 16,0 МО/мл. Препарат клітинних стінок разом із НОДА викликав формування менш напруженого титру антитіл – від 0,5 до 1,0 МО/мл на 2-3-му тижні, який надалі знизився до 0,25 МО/мл. Швидке збільшення рівня антитіл виявила комбінація НОДА з розведеним 1:2 бактеріальним антигеном: через тиждень після імунізації рівень імунітету складав 0,5 МО/мл, на другому тижні він досяг значення 4,0 МО/мл, а надалі стабілізувався на рівні 2,0 МО/мл. Розведення БА 1:2000, в комбінації з аналогічною дозою дифтерійного анатоксину дало мінімальні рівні імунітету – 0,03 МО/мл – на другому та четвертому тижні.

Введення досліджуваних антигенних препаратів ад'ювантів у склад офіційної дифтерійної вакцини зі зменшеним антигенним навантаженням АД-М при зменшенні її дози у 5 разів – до 1 Lf (К), підтвердило ад'ювантну дію препаратів (табл. 4).

Комбінація (№ 1) вакцини АД-М (1 Lf) і 0,5 мл розведеного у 2,5 рази препарату ДЗ обумовила високий рівень антитоксинів з другого тижня імунізації (4,0 МО/мл), надалі захисний рівень зберігався, тоді як у контролі (К) сероконверсії не відбулося. У тварин, вакцинованих з додаванням до вакцини АД-М 0,5 мл препарату БА (№2) та 0,1 мл препарату БА-ф (№ 3), який було одержано за допомогою фільтрації БА через фільтри «Владіпор», імунізація комбінованим препаратом виявилась найбільш результативною: титри протидифтерійних антитіл досягли стабільних високих показників – 4,0-8,0 МО/мл.

Таблиця 4.

**Рівень дифтерійних антитоксинів в сироватках крові кролів, вакцинованих зменшеними дозами вакцини АД-М в поєднанні з досліджуваними антигенними препаратами**

№№ пп	Склад вак- цини	Рівень антитоксинів, МО/мл			
		7 днів	14 днів	21 день	28 днів
К	0,1 мл АД-М (1 Lf)	0	0	0	0
1	0,1 мл АД-М (1 Lf) + 0,5 мл ДЗ (1: 2,5)	0	4,0	1,0	0,25
2	0,1 мл АД-М (1 Lf) + 0,5 мл БА	0,125	8,0	8,0	4,0
3	0,1 мл АД-М (1 Lf) + 0,1 мл БА-ф	4,0	4,0	8,0	4,0



Основними вимогами до якості вакцин є поєднання їх ефективності та нешкідливості [17]. Вивчення специфічної безпечності досліджуваних антигенних препаратів шляхом постановки кролям внутрішньошкірної проби з досліджуваними антигенними препаратами різного ступеню очищення показало, що у перші регламентовані чотири дні спостереження найбільш реактогенним виявився препарат ДЗ – у двох кролів з трьох спостерігалися інфільтрати до 8 мм у діаметрі, а в однієї з тварин – очаг некрозу. Зони шкірних реакцій на введення препарату БА виявилися майже вдвічі меншими – 4,5 мм. Найменш реактогенним на даному етапі спостережень виявився препарат БА-ф, який призвів лише до появи невеликого почервоніння (2 мм) у однієї тварини. Препарати клітинних стінок та цільноклітинної вакцини відразу ж дали формування гіперемії та інфільтрації (5 мм і 2,8 мм, відповідно).

Подовження строку спостереження за розвитком шкірних реакцій на досліджувані антигенні препарати до 15 днів дало можливість виявити появу пізніх реакцій на препарати ДЗ, БА і навіть на первісно ареактогенний препарат БА-ф при збільшенні середніх діаметрів зон інфільтрації: 13 мм, 10,5 мм, 7 мм, відповідно. Реакції на препарат клітинних стінок та цільноклітинну дифтерійну вакцину в цей період редукувалися.

Розведення препарату БА удвічі (БА 1:2) дозволило усунути шкірні реакції на його введення, ад'ювантні властивості при цьому збереглися: титр антитоксинів коливався від 0,5 МО/мл на першому тижні після вакцинації до 4,0 МО/мл на другому та 2,0 МО/мл на 3-4-му тижнях.

Застосування гель-хроматографії для очищення препарату БА-ф дало можливість виділити фракцію протеїнів з молекулярною масою понад 13 тис. Дальтон, питома вага якої в середньому перевищувала 50 % в загальному складі виділених фракцій, та низькомолекулярні фракції від 1 до 10 тис. Дальтон, на які приходилися одиничні відсотки.

Імунізація монопрепаратами вказаних фракцій не призвела до появи антитоксинів у крові тварин. Не було зареєстровано жодних шкірних реакцій.

Випробовування їх ад'ювантної дії щодо нативного очищеного дифтерійного анатоксину (в дозі 20 Lf, 0,4 мл) на лабораторних тваринах з нульовими титрами дифтерійних антитоксинів, імунізованих у минулому році експериментальними дифтерійними вакцинними препаратами, призвело до розвитку напруженого гуморального імунітету – до 32,0 МО/мл. Цей рівень зберігався впродовж строку спостереження при вакцинації комбінованим антигенним препаратом з фракцією протеїнів з молекулярною масою понад 13 тис. Да. Інші, низькомолекулярні, фракції теж були здатні активно стимулювати антитоксичний імунітет: у порівнянні з дією НОДА контрольний рівень антитоксинів (0,25 МО/мл) на другому тижні було перевищено у 128 разів, а на 3-4-му тижні у 4-8 разів.

## Висновки

1. Показано принципову можливість удосконалення дифтерійної вакцини за рахунок поєднання нативного очищеного дифтерійного анатоксину та ад'юванту бактеріального походження, виготовленого з мікробної маси токсигенного штаму *S. diphtheriae* за допомогою різних фізичних чинників.

2. Вакцинація тварин досліджуваними дифтерійними бактеріальними антигенними препаратами різного ступеня очищення (дезінтеграт, супернатант, фільтрат, гель-хроматографічні фракції) разом із нативним очищеним дифтерійним анатоксином призводить до формування захисного рівня гуморально-антитоксичного імунітету.

3. Послідовна очистка мікробного дезінтеграту фізичними методами (центрифугування, фільтрація, препаративна рідина гель-хроматографія) або адекватне розведення антигенних препаратів дозволяють ефективно усунути реакції на вакцинацію експериментальними антигенними препаратами *S. diphtheriae* при збереженні їх ад'ювантної дії.

**Перспективи подальших досліджень.** Одержані за допомогою фізичних чинників препарати поверхневих антигенів збудника є біологічними платформами для подальшої розробки удосконалених комбінованих вакцин проти дифтерії.

## Література

- WHO/Diphtheria reported cases. Last update: 15-July-2018 (data received as of 09-Jul-18).
- Global Vaccine Action Plan 2011 – 2020. Immunization, Vaccines and Biologicals.
- WHO data. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2018 global summary. Coverage time series for Ukraine (UKR). Last updated 15-Jul-2018 (data as of 15-Jul-2018).
- Chudnaya LM, Oksiyuk VG, Krasyuk LS, Moroz LV, Bryzhata SI, Skuratovskaya IM, i dr. Ehpideologicheskaya situatsiya po difterii na Ukrainie. Ehpideologiya i infektsionnye bolezni. 1999;1:10-2. [in Russian].
- Kolesnikov MM, Petrusevich TV. Vivchennya mozhlivosti viniknennya timchasvoi sprijnyatlivosti do difterijnogo toksinu u shcheplenih tvarin. Suchasni infekcii. 2002;4:69-71. [in Ukrainian].
- Demihovs'ka OV, Chudna LM. Epidemiya difterii v Ukraini: pidsumki i uzagal'nennya. Ukrayns'kij medichnij chasopis. 1999;3(12):56-8. [in Ukrainian].
- Narkevich NI, Tymchakovskaya IM. Osobennosti raspostraneniya difterii na fone immunizatsii detej. Zhurnal mikrobiologii, ehpideiologii, immunologii. 1996;2:25-9. [in Russian].
- Kharseeva GG, Alieva AA. Adhesion of *Corynebacterium diphtheriae*: the role of surface structures and formation mechanism. Zh. Mikrobiol. (Moscow). 2014;4:109-17.
- Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity. 2011;34(5):637-50.
- Rusek P, Wala M, Drusczyńska M, Fol M. Infectious Agents as Stimuli of Trained Innate Immunity. Int J Mol Sci. 2018 Feb 3;19(2). pii: E456. DOI: 10.3390/ijms19020456
- Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. Science. 2016 Apr;352(6284):6284.
- Locht C, Mielcarek N. Live attenuated vaccines against pertussis. Expert Rev Vaccines. 2014 Sep;13:1147.
- Shmeleva EO, avtor; Shmeleva EO, patentoobladatel'. Sposob povysheniya nespecificheskoj rezistentnosti organizma i sposob polucheniya preparata dlya povysheniya nespecificheskoj rezistentnosti organizma. № 2019181 RU; 1994 Sent 15. [in Russian].
- Isaenko EYu. Primenenie ul'trazvuka dlya dezintegratsii mikrobnih kletok. Annals of Mechnicov Institute. 2008;1. Dostupno: www.imiamn.org/journal.htm 5 [in Russian].

15. Yelyseieva IV, Doroshenko AO, Babich EM, Zhdamarova LA, Bilozers'kij VI, Gorbach TV. Vznachennya osoblivostej spektra fluorescencii zrazkiv nativnogo ochishchenogo difterijnogo anatoksinu. Zhurnal klinicheskij i eksperimental'nyh medicinskih issledovanij. 2017;5(1):680-9. [in Ukrainian].
16. Babych YeM, Yelyseieva IV, Bilozerskyi VI, Zhdamarova LA, Isaienko OYu, Bobyrieva IV, Horbach TV, vynakhidnyky; Derzhavna ustanova «Instytut mikrobiolohiyi ta imunolohiyi im. I. I. Mechnykova NAMN Ukrainy», patentovlasnyk. Sposib otrymmannya bakteriiinoho dyfteriinoho antyheny. № 86891 UA. 2014 Sich 10. [in Ukrainian].
17. Ada G. The importance of vaccination. Front Biosci. 2007Jan;1(12):1278-90.

## **ПОВЕРХНЕВІ АНТИГЕНИ ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ, ОДЕРЖАНІ ЗА ДОПОМОГОЮ ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ, ЯК БІОЛОГІЧНА ПЛАТФОРМА ДЛЯ РОЗРОБКИ КОМБІНОВАНОЇ ДИФТЕРІЙНОЇ КАНДИДАТ-ВАКЦИНИ**

**Елисеєва І. В., Бабич Є. М., Ждамарова Л. А., Білозерський В. І., Колпак С. А.**

**Резюме.** Досліджені практичні аспекти підходів до розробки комбінованої дифтерійної вакцини на основі бактеріального дифтерійного антигену, одержаного за допомогою дії фізичних факторів. Оцінювалася ефективність дії різних фізичних факторів (ультразвук, вузькосмугове електромагнітне випромінення надзвичайно високої частоти, лазерне опромінення) на мікробні клітини *C. diphtheriae* за біохімічним складом одержаних препаратів. Проводилась оптимізація режимів ультразвукового опромінення біомаси патогену для одержання поверхневих бактеріальних антигенів. Вивчалися антигенні та ад'ювантні властивості експериментальних препаратів. Особлива увага приділялася забезпеченню їх специфічної нешкідливості, котра досягається послідовною очисткою мікробного дезінтеграту фізичними методами (центрифугування, фільтрація, препаративна рідинна гель-хроматографія) або адекватним їх розведенням.

**Ключові слова:** дифтерійна вакцина, бактеріальний дифтерійний антиген, ультразвук, електромагнітне випромінення надзвичайно високої частоти, лазерне опромінення.

## **ПОВЕРХНОСТНЫЕ АНТИГЕНЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ПОМОЩИ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, КАК БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ КОМБИНИРОВАННОЙ ДИФТЕРИЙНОЙ КАНДИДАТ-ВАКЦИНЫ**

**Елисеєва І. В., Бабич Є. М., Ждамарова Л. А., Белозерський В. І., Колпак С. А.**

**Резюме.** Исследованы практические аспекты разработки комбинированной дифтерийной вакцины на основе бактериального дифтерийного антигена, полученного при помощи физических факторов. Оценивалась эффективность воздействия различных физических факторов (ультразвук, узкополосное электромагнитное излучение сверхвысокой частоты, лазерное излучение) на микробные клетки *C. diphtheriae* по биохимическому составу полученных препаратов. Проводилась оптимизация режимов ультразвукового облучения биомассы патогена для получения поверхностных бактериальных антигенов. Изучались антигенные и адъювантные свойства экспериментальных препаратов. Особое внимание уделено обеспечению их специфической безопасности, которая достигается последовательной очисткой микробного дезинтеграта физическими методами (центрифугирование, фильтрация, препаративная жидкостная гель-хроматография) или адекватным их разведением.

**Ключевые слова:** дифтерийная вакцина, бактериальный дифтерийный антиген, ультразвук, электромагнитное излучение сверхвысокой частоты, лазерное излучение.

## **SURFACE ANTIGENS OF C. DIPHTHERIAE OBTAINED BY PHYSICAL FACTORS AS A BIOLOGICAL PLATFORM FOR THE DEVELOPMENT OF COMBINED DIPHTHERIAL CANDIDATE-VACCINE**

**Yelyseyeva I. V., Babych E. M., Zhdamarova L. A., Belozersky V. I., Kolpak S. A.**

**Abstract.** Diphtheria infection is currently recorded mainly in countries endemic in diphtheria. According to the WHO, in 2017, Nigeria (7616), India (5293), Indonesia (954), Venezuela (786), Nepal (728), Pakistan (560) reported the highest incidence of diphtheria. In all of these countries, there is a tendency to increase the incidence compared to 2016, especially in Pakistan – 46.7 times and in Venezuela – 25.4 times. Within them, diphtheria remains a serious health problem and is, as a result of intensive migration processes in the modern world, a potential risk for countries epidemiologically well-off with diphtheria. The last epidemic rise of diphtheria in the countries of Eastern Europe in the 90s of the last century was on the background of significant immunization rates and a high proportion of vaccinated among the sick. Clinically expressed and toxic forms of diphtheria have been recorded even in fully vaccinated people. Among the causes of the incidence of diphtheria in vaccinated children, scientists call the possible use of drugs with insufficient antigenic load, insufficient immunogenicity of drugs used, violation of immunization schemes, impairment of the immune status of children and a certain percentage of truly refractory children. The indicated epidemiological features of the rise of morbidity, as well as the existence of endemic diphtheria territories raised a number of questions about the effectiveness of vaccine prophylaxis of this dangerous infection and forcing scientists to continue to seek ways to improve it. Practical aspects of the development of a combined diphtheria vaccine based on bacterial diphtheria antigen obtained by physical factors were studied. The aim of the study was development of approaches to obtaining surface antigens of *C. diphtheriae* bacterial cells as a biological platform for the creation of a combined vaccine against diphtheria with a bacterial component by physical factors. The efficiency of various physical factors (ultrasound, narrow-band electromagnetic radiation of ultrahigh frequency, laser radiation) was evaluated for *C. diphtheriae* microbial cells according to the biochemical composition of the preparations obtained. Optimization of ultrasonic irradiation of biomass pathogen for obtaining surface bacterial antigens was carried out. Antigenic and adjuvant properties of experimental preparations were studied. Particular attention is paid to ensuring their specific safety, which is achieved by sequential purification of the microbial disintegration by physical methods (centrifugation, filtration, preparative liquid gel chromatography) or by adequate dilution. It is

shown the principle opportunity of improving the diphtheria vaccine by combining the native purified diphtheria toxoid and adjuvant of bacterial origin made from the microbial mass of the toxigenic strain *C. diphtheriae* by various physical factors. Vaccination of animals with investigated diphtheria bacterial antigenic preparations of different degree of purification (disintegrate, soluble antigenic complexes, filtrate, gel-chromatographic fractions) together with native purified diphtheria toxoid leads to stimulation of humoral antitoxic immunity. Sequential purification of the microbial disintegrator by physical methods (centrifugation, filtration, preparative liquid gel chromatography), or adequate dilution of antigenic preparations, effectively eliminate the skin reactions to vaccination with experimental *C. diphtheriae* antigen preparations and preservation of adjuvant effect. Prepared *C. diphtheriae* surface antigen agents obtained by different physical factors are biological platforms for the further development of advanced combined diphtheria vaccines.

**Key words:** diphtheria vaccine, bacterial diphtheria antigen, physical factors, ultrasound, electromagnetic radiation of ultrahigh frequency, laser irradiation.

*Рецензент – проф. Лобань Г. А.  
Стаття надійшла 27.07.2018 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2018-3-145-256-259

УДК 579.61

*Скляр Т. В., Лаврентьєва К. В., Кременчуцька П. Є., Лихолат О. А., Джу́жа Д. О.*

## **ОСОБЛИВОСТІ СТІЙКОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ МІКРООРГАНІЗМІВ У СКЛАДІ МІКРОФЛОРИ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ У ХВОРИХ НА ГЕПАТИТ В**

**Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара (м. Дніпро)**

**polinakrr@yandex.ru**

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Дослідження виконано у межах науково-дослідної теми: перспективні для використання людиною біологічні властивості мікроорганізмів – компонентів природних і штучних біоценозів (номер державної реєстрації 0118U003277), що виконується на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара.

**Вступ.** Протягом двох останніх десятиліть відзначається істотне збільшення випадків захворювання на хронічні гепатити, це обумовлено покращенням діагностики, адже лише в минулому столітті ідентифіковано вірус гепатиту С, а 1990 році вдалося розшифрувати структуру вірусу гепатиту Е, G, D [1]. За різними даними на земній кулі носіїв вірусу гепатиту В від 400 мільйонів до 2 мільярдів людей, із них 40% – переносять гострий гепатит у субклінічний формі, у 10-25 % випадків хронічне носійство гепатиту В призводить до тяжких захворювань печінки, а 2 мільйони людей щорічно помирають від гепатиту В. Діти що переохворіли гострим гепатитом у 90% виявляються хронічні захворювання печінки. В Україні 2,2 % населення є носіями HBsAg [2].

За даними Центру медичної статистики МОЗ України, захворюваність хронічними гепатитами у середньому по Україні складала у 2005 році 440,7 на 100 тис. населення. Найбільш часто в дитячому віці зустрічаються гепатити вірусної етіології – В, С, D, G та ін. Так, частота поширення гепатиту В досягає 20 – 30%, гепатиту С – 32-43% [3,4].

Відомо, що у хворих на гепатит В в порожнині товстої кишки (ПТК) створюються сприятливі умови для розвитку дисбіотичних зсувів, активації умовно патогенних мікроорганізмів і прояву їх агресивних властивостей. Це зумовлено зміною середовища проживання мікроорганізмів у товстій кишці внаслідок порушень функціонального стану печінки, жовчовиділення, морфофункціональних розладів шлунку, підшлункової залози і кишок, порушень секретор-

но-ферментативної діяльності шлунково-кишкового тракту (ШКТ) [5].

Актуальність гепатиту В зумовлена високим рівнем захворюваності, складністю патогенезу, недостатньою ефективністю лікування, тяжкими наслідками хвороби [6].

**Метою роботи** було вивчення складу мікрофлори товстого кишечника людей хворих на гепатит В.

**Об'єкт і методи дослідження.** Проведена діагностика за допомогою імуноферментного аналізу на виявлення гепатиту В. Діагностику проводили за допомогою тест-системи ІФА-HBsAg. Набір призначений для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) в сироватці або плазмі крові людини «in vitro» методом твердофазного імуноферментного «сендвіч»-аналізу. Діагноз вірусного гепатиту В підтверджувався виявленням у сироватці крові HBsAg та Anti-HBc IgM методом ІФА [7].

Для поставленої задачі було залучено 45 чоловік віком від 18 до 57 років, які були поділені на 3 групи:

- група – люди віком від 18 до 30 років (n=12);
- група – люди віком від 30 до 45 років (n=20);
- група – люди віком від 45 до 57 років (n=13).

Після цього проводили бактеріологічне дослідження мікрофлори товстого кишечника людей хворих на гепатит В для виявлення умовно-патогенної аеробної та анаеробної мікрофлори та визначення ступеню дисбіозу [8].

На наступному етапі визначали чутливість до антибактеріальних препаратів виділених штамів умовно-патогенних бактерій методом дифузії в агарі [9].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми Microsoft Excel.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Визначено, що серед 45 обстежених осіб у 35 (78%) було виявлено гепатит В. Дослідження стану мікробіоценозу товстої кишки проведено у 35 пацієнтів хворих на гепатит В. Проведені мікробіологічні дослідження вмісту товстої кишки у хворих на гепатит В показали наявність змін якісного та кількісного складу мікрофлори у 100,0 % хворих (**рис. 1**).