

Доклинические испытания безопасности применения и иммуногенности брюшнотифозной молекулярной вакцины

А.И.Маматкулов¹, П.Е.Игнатов²

¹Ташкентский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток, Ташкент, Республика Узбекистан;

²IGN-International, Лос-Анджелес, США

Статья посвящена разработке и использованию в практических условиях медицины инновационного направления для борьбы с брюшным тифом, а именно: профилактики болезни посредством санации хронического брюшнотифозного бактерионосительства и вакцинации подлежащего контингента брюшнотифозной молекулярной вакциной жидкой. При этом ликвидируется возможность передачи этого заболевания людям от хронических бактерионосителей. Новизна этого исследования заключается в конструировании вакцины двойного назначения как для профилактики, так и для специфической санации (лечения) хронического брюшнотифозного бактерионосительства. На основании этого изучения были разработаны лечебно-профилактическая вакцина и программа борьбы с брюшным тифом, проведено доклиническое испытание этой вакцины на лабораторных животных.

Ключевые слова: брюшной тиф, бактерионоситель, вакцина, адъювант, хронический носитель

Для цитирования: Маматкулов А.И., Игнатов П.Е. Доклинические испытания безопасности применения и иммуногенности брюшнотифозной молекулярной вакцины. Бактериология. 2023; 8(2): 56–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-56-59

Safety of the typhoid molecular vaccine

A.I.Mamatkulov¹, P.E.Ignatov²

¹Tashkent Research Institute of Vaccines and Serums, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

²IGN-International, Los Angeles, USA

The work is devoted to the development and use in practical medical conditions of an innovative direction for the fight against typhoid fever, namely: the prevention of the disease through the rehabilitation of chronic typhoid bacteriocarrier and vaccination of the subject contingent with typhoid molecular vaccine liquid. At the same time, the possibility of transmitting this disease to people from chronic bacteria carriers is eliminated. The novelty of this study lies in the construction of a dual-use vaccine for both prevention and specific sanitation (treatment) of chronic typhoid bacteriocarrier. Based on this study, a therapeutic vaccine and a typhoid control program were developed; preclinical testing of this vaccine in laboratory animals.

Key words: typhoid fever, bacteria carrier, vaccine, adjuvant, chronic carrier

For citation: Mamatkulov A.I., Ignatov P.E. Safety of the typhoid molecular vaccine. Bacteriology. 2023; 8(2): 56-59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-56-59

Проблема брюшного тифа остается одной из наиболее актуальных в инфекционной патологии. Как указывают отдельные авторы, уровень заболеваемости брюшным тифом во многих государствах, в том числе и в странах СНГ, практически не снижается. Эпидемия брюшного тифа в Таджикистане в 1996–1998 гг., получившая название супер-эпидемии, характеризовалась мультилекарственной устойчивостью возбудителя и охватом широких слоев населения. Только в 1996 г. в Республике Таджикистан было зарегистрировано

более 10 тыс. случаев брюшного тифа с тяжелым и осложненным течением.

Благодаря крупным социально-экономическим и культурным преобразованиям заболеваемость брюшным тифом в цивилизованных странах (США, Франция, Англия, Германия и др.) за последнее десятилетие неуклонно снижалась и в настоящее время в большинстве регионов стран СНГ, кроме Таджикистана и Кыргызстана, регистрируется как спорадическая. Это обстоятельство вместе с утвердившимся пред-

Для корреспонденции:

Маматкулов Алишер Ибрагимович, директор СП ООО BIBINOR, младший научный сотрудник Ташкентского научно-исследовательского института вакцин и сывороток

Адрес: 100084, Республика Узбекистан, Ташкент, Юнусабадский район, ул. Чингиза Айтматова, 37
Телефон: (+998) 71 234-77-67
E-mail: bibinor@list.ru

Статья поступила 20.03.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Alisher I. Mamatkulov, Director of JV LLC «BIBINOR», Junior Researcher, Tashkent Research Institute of Vaccines and Serums

Address: 37 Chingiz Aitmatov str., Yunusabad district, Tashkent, 100084, Republic of Uzbekistan
Phone: (+998) 71 234-77-67
E-mail: bibinor@list.ru

The article was received 20.03.2023, accepted for publication 30.06.2023

ставлением о более легком течении современного брюшного тифа, наряду с резким снижением смертности от него, может привести к выводу о том, что эта болезнь перестала быть проблемой как в эпидемиологическом, так и в клинικο-терапевтическом отношении. Однако подобный вывод был бы преждевременным и неверным. Регистрируемый на территории Таджикистана с 1992 г. и на территории Узбекистана с 1996 г. новый вариант *Salmonella enterica* серотип *Typhi*, устойчивый к ампициллину, левомицетину, тетрациклину *S. Typhi* 61-01 антибиотиковар, вызывает более тяжелое течение брюшного тифа с тяжелейшими осложнениями, такими как инфекционно-токсический шок, кровотечение, перфорация, тенденция к более выраженному формированию бактерионосительства, чем штаммы, чувствительные к этим антибиотикам.

До настоящего времени проблема заболеваемости брюшным тифом остается нерешенной из-за отсутствия эффективных препаратов, необходимых для нейтрализации основных источников возбудителя инфекции – хронических бактерионосителей. Бактерионосители являются основными источниками инфекции как при водных, так и при пищевых и спорадических случаях заражения брюшным тифом с различными клиническими проявлениями. Одной из самых крупных «водных» эпидемий за последние 25 лет была эпидемия брюшного тифа в Таджикистане, где в 1996–1997 гг. было официально зарегистрировано 29 382 заболевших брюшным тифом, из которых 10 526 (38%) случаев приходилось на г. Душанбе. Обращает на себя внимание, что в этой вспышке более чем у половины переболевших формировалось хроническое носительство по причине приобретения резистентности к этиотропному препарату для лечения (хлорамфеникол, левомицетин), предложенному Всемирной организацией здравоохранения [1].

Для профилактики брюшного тифа используют различные иммунобиологические препараты, но вакцин, предназначенных как для санации хронических носителей, так и для профилактики брюшного тифа, т.е. вакцинных препаратов двойного действия, в мире не существует.

В Научно-исследовательском институте эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний при Министерстве здравоохранения Республики Узбекистан (НИИЭМИЗ МЗ РУз, ныне РСНПМЦИПЗ) совместно с СП ООО Bibinor была разработана отечественная брюшнотифозная молекулярная вакцина жидкая (БМВ). На основании Временной фармакопейной статьи (ВФС) вакцина предназначена для санации хронического брюшнотифозного бактерионосительства и профилактики заболевания. Препарат зарегистрирован в Главном управлении по контролю качества лекарственных средств и медицинской техники 16 октября 2006 г. за №004-06 и разрешен к клиническому применению приказом Министерства здравоохранения №440 от 16 октября 2006 г.

Вакцина с профилактической целью вводится в дозе 0,5 мл, а с лечебной целью для санации хронических носителей возбудителей брюшного тифа – 1,5 мл по схеме. Способ введения – внутримышечно. Препарат запатентован [2].

Целью настоящей работы является описание результатов доклинических испытаний БМВ – Vi-антигенной вакцины на основе производственного штамма *S. Typhi*.

Материалы и методы

Клинико-лабораторные, микробиологические исследования проводились в лаборатории молекулярной эпидемиологии и специфической профилактики инфекционных заболеваний НИИЭМИЗ МЗ РУз.

Для проведения лабораторно-микробиологического скрининга использованы гемокультуры, выделенные в Самаркандской и Наманганской областях, в сравнении с культурами из Национальной коллекции микроорганизмов.

Биологические свойства вакцинного штамма сравнили с 25 штаммами возбудителя брюшного тифа, выделенными от больных в возрасте 16–55 лет с различными клиническими формами брюшного тифа, подтвержденного бактериологическими и серологическими методами.

Доклинические испытания БМВ по изучению специфической безвредности и иммуногенности проводили на 4 морских свинках и 108 нелинейных белых мышах смешанного поголовья массой 15 ± 1 г.

Курс лечения (санации) проведен на 106 больных – хронических носителях брюшного тифа, контрольную группу составили 35 носителей.

В работе использовались микробиологические и лабораторные методы исследования: кристаллографический, серологический и бактериологический. Содержание специфических противобрюшнотифозных Vi-антител определяли в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) микрометодом на аппарате «Такачи» набором реагентов «Диагностикум эритроцитарный сальмонеллезный Vi-антигенный жидкий для РПГА» (ФГУН «НИИЭМ им. Пастера» Роспотребнадзора, Российская Федерация). При наличии антител к возбудителю брюшного тифа наблюдалась гемагглютинация sensibilizированных Vi-антигеном куриных эритроцитов, что приводило к образованию на дне U-образных лунок планшета «зонтика» из осевших эритроцитов. При отсутствии антител к возбудителю брюшного тифа осевшие эритроциты образовывали «точку».

Специфическую безвредность определяли по методике, изложенной в ФС 42Уз-0130BC-2004. Иммуногенность препарата, содержащего в 1 мл 0,2 мг брюшнотифозного антигена, определяли параллельно в сравнении с отраслевым стандартным образцом (ОСО) иммуногенности на нелинейных белых мышах. Вакцину разводили 0,85%-м раствором натрия хлорида так, чтобы в 0,5 мл содержались уменьшающиеся количества антигена (0,025; 0,0025; 0,00025; 0,000025 мг). По 0,5 мл каждого разведения вводили 18 мышам подкожно в область спины. Через 10–12 дней иммунизированных мышей (по 8 в каждой группе) заражали внутривнутрибрюшинно в дозе 2 LD₅₀ тест-культурой брюшного тифа в объеме 0,5 мл. Контроль – 18 мышей. Дозу заражения устанавливали предварительно за 3–4 дня перед заражением опытных животных и повторно в день заражения на одной и той же партии мышей, которые были взяты для иммунизации. 16–18-часовую тест-культуру брюшного тифа смывали 0,85%-м раствором натрия хлорида с агара Хоттингера, доводили ее мутность до 10 ед. по ОСО мутности 42-59-85 (мутность ОСО в 10 ед. эквивалента составляет 0,85 млрд микробных клеток). Для заражения полученную

Таблица. **Определение иммуногенности вакцины БМВ в эксперименте на белых мышях**
 Table. **Determination of the immunogenicity of the typhoid molecular vaccine (TMV)vaccine in an experiment on white mice**

	1-я группа / Group 1		2-я группа / Group 2		3-я группа / Group 3		4-я группа / Group 4		5-я группа / Group 5		Контроль / Control	
Мышей / Mice	18		18		18		18		18		18	
Доза вакцины / Vaccine	Субстанция		1:10		1:100		1:1000		1:10000			
	10 ⁰		10 ¹		10 ²		10 ³		10 ⁴			
Заражающая доза / Infecting dose	10 ⁶ –10 ⁷		10 ⁶ –10 ⁷		10 ⁶ –10 ⁷		10 ⁶ –10 ⁷		10 ⁶ –10 ⁷		10 ⁶ –10 ⁷	
В день наблюдения / At the day of observation	Выжило / Survived	Погибло / Died	Выжило / Survived	Погибло / Died	Выжило / Survived	Погибло / Died	Выжило / Survived	Погибло / Died	Выжило / Survived	Погибло / Died	Выжило / Survived	Погибло / Died
1-й день	18	0	18	0	18	0	15	3	13	5	8	10
2-й день	18	0	18	0	18	0	14	1	9	4	3	5
3-й день	18	0	18	0	18	0	13	1	7	2	0	3
Итого	18	0	18	0	18	0	13	5	7	11	0	18
Выживаемость, % / Survival	100		100		100		72,2		38,8		0	

взвесь разводили до 110 ± 30 млн микробных клеток в объеме 0,5 мл. Для определения LD₅₀ тест-культуру разводили двукратно, чтобы получить не менее 4 доз. Опытным и контрольным мышам внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл соответствующей дозы тест-культуры.

Результаты и обсуждение

Доклинические испытания вакцины проводились по инновационному проекту на основании Государственного заказа ИСС-2012-6-18 «Вакцина, предназначенная для профилактики заболевания брюшным тифом и санации хронического брюшнотифозного бактерионосительства».

На первый год, согласно техническому заданию, была запланирована наработка определенного количества препарата с изучением специфической безвредности и иммуногенности на основании ВФС на лабораторных животных.

Результаты иммунизации мышей представлены в таблице.

Наблюдение за животными в течение 3 дней показало, что в первых 3 экспериментальных группах отмечались идентичные результаты, несмотря на то, что животным 2-й и 3-й группы была введена разбавленная в 10 и 100 раз вакцина. Следовательно, у мышей этих групп были в достаточной степени выработаны антитела. Из мышей 4-й группы только у 13 был выработан иммунитет, т.к. 5 из них погибли уже в первые 2 дня эксперимента. Разведение вакцины в 4 раза оказалось еще менее эффективным, что доказывается гибелью мышей: в 1-е сутки – 5, во 2-е – 4, в 3-и – еще 2 мыши. К концу исследуемого периода осталось 7 мышей, что составило 38,8%. В контрольной группе мышей, не получивших вакцину, погибли все 18 (100%) грызунов.

Следующим этапом было исследование местнораздражающего действия выбранной дозы.

Морским свинкам массой 300–350 г препарат вводили подкожно по 2,5 мл в каждый бок. Наблюдение за животными вели ежедневно в течение 7 дней. Ни у одного животного на месте введения вакцины не образовалось уплотнение, не развился абсцесс или некроз. В целях исследования содержания Vi-антигена животные содержались до 14 дней.

Далее изучали специфическую безвредность вакцины. Морским свинкам вводили по 5 мл вакцины БМВ (по 2,5 мл в каждый бок). После инъекций на каждом боку морских

свинок изучали наличие местной температуры, аллергической реакции и наличие воспалительной реакции на месте введения вакцины.

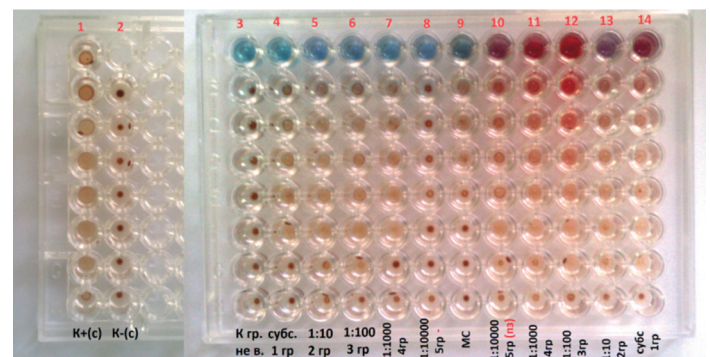


Рисунок. **Результаты РПНА.**

Ряды лунок: 1 – положительный контроль сыворотки; 2 – отрицательный контроль сыворотки; 3 – сыворотки крови контрольной группы невакцинированных мышей; 4 – сыворотки крови вакцинированных субстанцией вакцины; 5 – сыворотки крови вакцинированных мышей в разведении 1:10; 6–8 – сыворотки крови мышей, вакцинированных в разведении 1:100, 1:1000, 1:10000 соответственно; 9 – сыворотка крови морской свинки – специфическая безвредность; 10 – сыворотки крови иммунизированных мышей в разведении 1:10 000 после заражения вирулентной культурой; 11 – сыворотки крови иммунизированных мышей в разведении 1:1000 после заражения вирулентной культурой; 12 – сыворотки крови иммунизированных мышей в разведении 1:100 после заражения вирулентной культурой; 13 – сыворотки крови иммунизированных мышей в разведении 1:10 после заражения вирулентной культурой; 14 – сыворотки крови мышей, иммунизированных субстанцией вакцины после заражения вирулентной культурой; 8-я лунка 3–14-го рядов – контрольная (физраствор).

Figure. Results of passive hemagglutination reaction.

Note: *Rows of holes: 1 – positive serum control, 2 – negative serum control, 3 – blood serum of the control group of unvaccinated mice, 4 – blood serum vaccinated with the vaccine substance, 5 – blood serum of vaccinated mice in dilution 1:10, 6 – blood serum of vaccinated mice in dilution 1:100, 7 – 1:1000, 8 – 1:10000, 9 – guinea pig blood serum – specific harmlessness, 10 – blood serum of immunized mice in a dilution of 1:10000 after infection with a virulent culture, 11 – blood serum of immunized mice in dilution 1:1000 after infection with a virulent culture, 12 – blood serum of immunized mice in dilution 1:100 after infection with a virulent culture, 13 – blood serum of immunized mice in a dilution of 1:10 after infection with a virulent culture, 14 – blood serum of immunized mice with a vaccine substance after infection with a virulent culture, 8 hole 3 – 14 rows of control (saline).

Результаты по определению иммуногенности и титра Vi-антител, образованных после иммунизации животных, отражены на рисунке.

Как видно из рисунка, контроли не вызывают сомнений, так как положительный контроль сыворотки определил титр 1:2560, а отрицательный контроль во всех разведениях был отрицательным, как и полученный отрицательный результат в 3-м ряду лунок с сыворотками крови невакцинированных контрольных мышей. В 4-м ряду лунок с сыворотками вакцинированных мышей субстанцией вакцины определился титр 1:640; в 5-м ряду с сыворотками иммунизированных мышей в разведении 1:10 также определился титр 1:640; в 6-м ряду с сыворотками крови иммунизированных мышей в разведении 1:100 выявился более высокий титр, равный 1:1280; в 7-м (разведение вакцины 1:1000) – 1:640; 8-й – в сыворотке крови иммунизированных мышей в разведении вакцины 1:10000 был выявлен самый низкий титр антител, равный 1:20; 9-й – в сыворотке крови МС – 1:80. С 10-го ряда лунок исключаются сыворотки крови иммунизированных мышей после их заражения вирулентной культурой брюшного тифа. Полученный титр 1:640 в 10-м ряду, при сравнении с результатом титра 1:20 при разведении вакцины 1:10000, можно объяснить тем, что при заражении возник результат вторичной иммунизации в более высоком количестве антигена. Результаты, полученные в рядах лунок 11 после заражения и 7 – до заражения (при разведении вакцины 1:1000), равный идентичному титру 1:640, указывают на хорошую иммуногенность вакцины, а результаты, полученные в рядах лунок 12 (1:1280) и 6 (1:1280) после и до заражения соответственно, – на высокую иммуногенность вакцины при разведении 1:100. Полученные титры при вакцинации мышей в разведении вакцины 1:10 и субстанцией вакцины (13-й и 14-й ряды лунок), равные 1:640, и после заражения вирулентной культурой, равные 1:320 и 1:1280 соответственно, являются подтверждением неиммуногенности выбранных концентраций антигена вакцины.

Проведенные доклинические исследования субстанции и вакцины БМВ в соответствии с общепринятыми рекомендациями и инструкциями показали следующее: вакцина БМВ обладает защитным эффектом в разведении 1:30 при внутрибрюшинном заражении лабораторных животных 2 LD₅₀ штаммом *S. Typhi*. Опыт по местнораздражающему действию при подкожном введении вакцины БМВ морским

свинкам в рабочей концентрации 1:30 показал отсутствие местнораздражающего действия. На основании этого исследования можно сделать вывод, что вакцина БМВ обладает защитным действием и специфически безвредна.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках инновационного проекта на основании Государственного заказа ИСС-2012-6-18.

Financial support

The work was carried out within the framework of an innovative project on the basis of the State Order ISS-2012-6-18.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Рафиев ХК, Нестеренко ВЕ, Лукьянов НВ, Пиррова АХ. Вспышки брюшного тифа в Республике Таджикистан. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2003;2:9-11.
2. Патент на изобретение IAP 20170193 от 30.12.2022 года «Способ получения жидкой брюшнотифозной молекулярной вакцины и способ лечения (санации) хронического брюшнотифозного бактерионосительства с её применением». Ташкент, 2022, 9 с.

References

1. Rafiev HC, Nesterenko VE, Lukyanov NV, Pyrrova AH. Outbreaks of typhoid fever in the Republic of Tajikistan. Epidemiology and Infectious Diseases. 2003;2:9-11.
2. Patent for invention IAP 20170193 dated December 30, 2022 "Method for obtaining liquid typhoid molecular vaccine and method for treating (sanation) of chronic typhoid bacteriocarrier with its use". Tashkent, 2022, 9 p.

Информация о соавторе:

Игнатов Пётр Евгеньевич, доктор биологических наук, профессор, президент IGN-International

Information about co-author:

Peter E. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, President of IGN-International (USA)