

# Получение и оценка качества полирибозилрибитолфосфата *Haemophilus influenzae* типа b – основного компонента вакцины против гемофильной инфекции

С.В.Коробова<sup>1</sup>, П.А.Стряхнин<sup>1</sup>, И.Ю.Курбатова<sup>1</sup>, И.А.Казаков<sup>2</sup>, Н.А.Развальяева<sup>1</sup>, И.В.Анкудинов<sup>1</sup>, Т.В.Ганчо<sup>1</sup>, В.А.Ледов<sup>1</sup>, П.Г.Апарин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ООО «Гритвак», Москва, Российская Федерация

Гемофильная инфекция, вызываемая грамотрицательной бактерией *Haemophilus influenzae* серотипа b, – часто встречающееся на территории России заболевание, характеризующееся серьезными осложнениями и высокой летальностью у детей. Вакцинация – основное средство, предотвращающее распространение заболевания. Эпитопы, ответственные за образование протективных антител, располагаются на бактериальном капсульном полисахариде полирибозилрибитолфосфат (ПРФ), который является основным вакцинным антигеном.

Целью работы было определение оптимальных способов очистки ПРФ и методов оценки его качества. ПРФ получали многоступенчатой очисткой цетавлоновым методом. Для контроля качества продуктов на разных стадиях получения использованы методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и ядерно-магнитного резонанса. Конечный продукт исследовали также методами, утвержденными в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XIV пересмотра по показателям: содержание белка, нуклеиновых кислот, рибозы, специфическая активность, пирогенность, подлинность. Подтверждена структура, антигенные характеристики и серологическая активность ПРФ из *H. influenzae* серотипа b. Отработаны методы контроля технологической цепочки выделения полисахарида ПРФ. Получаемый продукт характеризуется высокой степенью очистки и сохранностью антигенных детерминант и может быть использован для конъюгации с белком-носителем для производства полноценного вакцинного препарата против гемофильной инфекции у детей. Показана возможность использования метода ядерно-магнитного резонанса для определения подлинности ПРФ, что позволяет заменить иммунохимический метод анализа, предлагаемый ГФ РФ XIV, на физико-химический.

**Ключевые слова:** *Haemophilus influenzae* тип b, полирибозилрибитолфосфат, высокоэффективная жидкостная хроматография, ядерно-магнитный резонанс, вакцина

**Для цитирования:** Коробова С.В., Стряхнин П.А., Курбатова И.Ю., Казаков И.А., Развальяева Н.А., Анкудинов И.В., Ганчо Т.В., Ледов В.А., Апарин П.Г. Получение и оценка качества полирибозил-рибитол-фосфата *Haemophilus influenzae* типа b – основного компонента вакцины против гемофильной инфекции. Бактериология. 2023; 8(3): 75–82. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-75-82

## Development and quality evaluation of the *Haemophilus influenzae* type b polyribozyl-ribitol-phosphate: the main component of the vaccine against hemophilian infection

S.V.Korobova<sup>1</sup>, P.A.Stryakhnin<sup>1</sup>, I.Yu.Kurbatova<sup>1</sup>, I.A.Kazakov<sup>2</sup>, N.A.Razvalyayeva<sup>1</sup>, I.V.Ankudinov<sup>1</sup>, T.V.Gancho<sup>1</sup>, V.A.Ledov<sup>1</sup>, P.G.Aparin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FBSI SRC Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>Gritvak LLC, Moscow, Russian Federation

Disease caused by the gram-negative bacterium *Haemophilus influenzae* of serotype b is a widespread in a territory of the Russian Federation. It is characterized by serious complications and high mortality in children. Vaccination is the main means of preventing the spread of the disease. The epitopes responsible for the formation of protective antibodies are located on the bacterial capsular polysaccharide polyribozyl-ribitol-phosphate (PRP), the main vaccine antigen.

### Для корреспонденции:

Коробова Светлана Вячеславовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Адрес: 115522, Москва, Каширское шоссе, 24  
Телефон: (499) 618-71-56

Статья поступила 08.09.2023, принята к печати 29.09.2023

### For correspondence:

Svetlana V. Korobova, PhD, senior scientist, laboratory of polysaccharide vaccines, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Address: 24 Kashirskoye shosse, Moscow, 115522, Russian Federation  
Phone: (499) 618-71-56

The article was received 08.09.2023, accepted for publication 29.09.2023

Goals of the work is determination of the optimal methods of PRP purification and methods to control its quality. PRP was obtained by multi-stage purification by the cetavlon method. HPLC and NMR methods were used to control the quality of products at different stages of production. The final product was also examined by methods approved in Ph RF14: protein, nucleic acids, ribose content, specific activity, pyrogenicity, authenticity. The substance meets all the requirements prescribed in Ph RF 14 only after cetavlon precipitation. It does not contain impurities, retains antigenic activity, apyrogenic. The use of HPLC and proton NMR methods at different stages of the substance purification provides picture about the preservation of its structure and purity. The structure, antigenic characteristics and serological activity of PRF from *H. influenzae* serotype b were confirmed. Methods for monitoring the technological chain of PRF polysaccharide isolation have been developed. The resulting product is characterized by a high degree of purification and preservation of antigenic determinants. It can be used for conjugation with a carrier protein for the production of a full-fledged vaccine. The possibility of using NMR method to determine the PRP authenticity is shown. It makes possible to replace the immunochemical method proposed by Ph RF 14 with a physical and chemical analysis method.

**Key words:** *Haemophilus influenzae* type b, polyribosylribitol phosphate, high-performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance, vaccine

**For citation:** Korobova S.V., Stryakhnin P.A., Kurbatova I.Yu., Kazakov I.A., Razvalyayeva N.A., Ankudinov I.V., Gancho T.V., Ledov V.A., Aparin P.G. Development and quality evaluation of the *Haemophilus influenzae* type b polyribozil-ribitol-phosphate: the main component of the vaccine against hemophilian infection. Bacteriology. 2023; 8(3): 75–82. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-75-82

**В**акцинация является основным средством, предотвращающим распространение инфекционных болезней. Среди них особое место занимает гемофильная инфекция [1]. Возбудитель заболевания – грамотрицательная бактерия *Haemophilus influenzae* серотипа b, которая является причиной серьезных инвазивных заболеваний у детей, таких как менингит, септический артрит, орбитальный целлюлит, эпиглоттит, бактериемия. Кроме того, она является частой причиной летальных исходов у детей [2]. Следует отметить, что на территории России гемофильная инфекция – часто встречающееся заболевание, ее показатели характеризуются региональными различиями и варьируют при менингите гемофильной этиологии от 5 до 15, а при гемофильной пневмонии – до 150 на 100 тыс. детей первых 5 лет жизни [3]. Наиболее восприимчивыми являются дети от 3 мес. до 5 лет. У новорожденных обнаруживают материнские антитела, защищающие их от гемофильной инфекции [4]. Для контроля распространения болезни в России вакцинация против гемофильной инфекции включена в национальный календарь прививок начиная с трехмесячного возраста [5]. Используемые для этих целей вакцины в основном производятся за рубежом. Препаратом для профилактики гемофильной инфекции, производимым на территории Российской Федерации, является вакцина гемофильная тип b полисахаридная конъюгированная лиофилизированная (производитель ФГУН «РостовНИИМП» Роспотребнадзора). Поэтому для более полного удовлетворения потребностей здравоохранения, в целях импортозамещения и ухода от зависимости от зарубежных производителей разработка производства российских вакцин полного цикла является приоритетной задачей отечественной фарминдустрии.

Установлено, что антитела к капсульному полисахариду (КПС) бактерии *H. influenzae* (полирибозилрибитолфосфат (ПРФ)) обладают защитными свойствами [6]. На его основе созданы все существующие вакцинные препараты. Очищенные полисахариды относятся к так называемым Т-независимым антигенам. Иммунный ответ на них развивается без участия Т-клеток. Они являются слабыми иммуногенами и не индуцируют у детей образования протективного иммунитета. Это обусловлено незрелостью у детей до 18 мес. В-клеток маргинальной зоны и меньшим количеством CD27<sup>+</sup> В-клеток памяти, поскольку В-клетки марги-

нальной зоны селезенки являются основной субпопуляцией, реагирующей на антиген [7, 8]. Поэтому для увеличения иммуногенности полисахариды конъюгируют с белком-носителем – столбнячным токсидом, наружным белком мембраны *Neisseria meningitidis*; CRM197 – нетоксичным производным дифтерийного токсина, содержащего замену глицина на глутаминовую кислоту в положении 52. Доставка полисахарида в конъюгированной с белком форме вызывает развитие Т-зависимого иммунного ответа. Конъюгат полисахарида с белком захватывается антиген-представляющими клетками, процессируется и представляется Т-клеткам. Активация антиген-специфических Т-клеток, в свою очередь, приводит к образованию В-клеток памяти, созреванию аффинности антител и продукции антител класса IgG1 и IgG3 [9, 10].

Таким образом, на бактериальном полисахариде ПРФ располагаются эпитопы, ответственные за образование протективных антител. Белок-носитель отвечает лишь за переключение иммунного ответа с Т-независимого на Т-зависимый. Поэтому эффективность вакцинного препарата во многом определяется качеством полисахарида ПРФ: его чистотой, сохранностью антигенных детерминант. Предприятием ООО «Гритвак» совместно с ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России разрабатывается вакцина против гемофильной инфекции на основе конъюгата капсульного полисахарида ПРФ с белком CRM197.

**Целью** данной работы являлось определение оптимальных способов очистки ПРФ бактерии *H. influenzae* серотипа b и методов оценки его качества.

## Методы

**Культивирование *H. influenzae* типа b.** Штамм *H. influenzae* 267 [11] перед выращиванием в ферментере рассевали на твердую питательную среду (сердечно-мозговой бульон, 4 мг/л НАД и 10 мг/л гемина) для контроля морфологических свойств и чистоты штамма. Затем культуру с твердой питательной среды смывали в колбу с жидкой питательной средой (350 мл) на основе аминокислот. Посевную культуру растили 10–12 ч в термостате при 37°C и проводили засев промышленного ферментера марки «АНКУМ» (рабочий объем 10 л). После засева *H. influenzae* определяли оптиче-

скую плотность среды в ферментере с помощью фотометра «КФК-3-01» при длине волны 530 нм. Подлинность и чистоту инокулята подтверждали агглютинацией со специфической антисывороткой и окрашиванием по Граму.

#### **Очистка КПС *H. influenzae***

**Первичная очистка.** Культуральную жидкость центрифугировали при 12 000 g, 7°C в течение 60 мин (Beckman Avanti). Супернатант концентрировали с использованием тангенциальных ультрафильтрационных мембран («Владисарт» 50 кДа).

**Обработка ферментами.** Добавляли фермент эндонуклеазу, 1 единица на 10 мл раствора, и инкубировали в течение 6 ч при 37°C и 170 об./мин на магнитной мешалке. Затем добавляли проназу Е, трипсин (тип I) и наргазу по 1 ед. на 10 мл раствора. Между добавлением каждой последующей протеазы выдерживали двухчасовую паузу. Проводили ультрафильтрацию на мембране.

**Осаждение цетавлоном** проводили по методу J.Кюо [12] с модификацией.

**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).** 0,1 мг очищенного КПС *H. influenzae* типа b растворяли в пробирке в 1 мл фосфатно-солевого буфера (0,2 М, рН ~7,4), перемешивали с помощью орбитального шейкера в течение 10 мин, затем с целью удаления возможных механических примесей подвергали центрифугированию на настольной центрифуге (1000 об./мин). 100 мкл супернатанта вводили с помощью шприца Hamilton в петлю хроматографа Agilent с рефрактометрическим детектором (скорость потока – 0,5 мл/мин, колонка – Shodex G-3000). Калибровочную прямую строили с помощью декстранов 270, 70, 50, 10, 5 кДа.

**Ядерный магнитный резонанс (ЯМР).** Спектры ЯМР были сняты на ЯМР-спектрометрах Bruker AM500 и Varian Unity 500 МГц при температуре образца 30°C. Оптимизированные условия для анализа: 2–3 мг полисахарида трижды лиофилизировали из 0,4 мл 99,9%-й дейтерированной воды (Apollo Scientific), растворяли в 0,7 мл той же дейтерированной воды и вводили в 5-миллиметровую ЯМР-пробирку. Спектр получали при температуре образца 30°C. 64 тыс. точек данных собираются в спектральной ширине 16 ppm с временем повторного цикла 6,1 с. Спектры взвешивали с уширением линии 0,2 Гц, преобразовывали по Фурье и готовили серию стандартных графиков

**Определение рибозы** проводили согласно общей фармакопейной статье (ОФС 1.2.3.0019.15 ГФ 14 РФ) с орциновым реагентом [13].

**Определение содержания белка** проводили по методу Бредфорда, согласно ОФС 1.2.3.0012.15 ГФ14 РФ [13].

**Определение содержания нуклеиновых кислот** проводили по методу Спирина, согласно ОФС.1.7.2.0018.15 ГФ14 РФ [13].

**Пирогенность** оценивали согласно ОФС.1.2.4.00105.15 ГФ14 РФ. Животному вводили 1 мкг ПРФ на 1 кг/живого веса [13].

**Подлинность.** Выполняется на коммерческих наборах Wellcogen™ *H. influenzae* b Rapid Latex Agglutination Test, согласно приложенной инструкции.

**Определение специфической активности.** На твердую фазу сорбировали конъюгат ПРФ с бычьим сывороточным

альбумином (БСА) в концентрации 1 мкг/мл (по ПРФ) в карбонат-бакарбонатном буферном растворе, при комнатной температуре 12–18 ч. По окончании инкубации планшеты отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т). Вносили последовательное разведение ПРФ (от 100 до 0,75 мкг/мл) совместно с сывороткой человека, содержащей антитела к ПРФ (09/222, NIBSC), в растворе 1% БСА ФСБ-Т. Инкубировали 1 ч при 37°C. Отмывали планшет ФСБ-Т. Вносили конъюгат антител кролика к IgG человека, меченных пероксидазой («Имтек»). Инкубировали 1 ч при 37°C, по окончании инкубации отмывали планшет ФСБ-Т. Вносили субстрат – 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид (ТМБ). Через 15 мин реакцию останавливали 10%-м раствором серной кислоты. Результаты учитывали при 450 нм.

#### **Результаты исследования**

##### **Технологическая цепочка получения ПРФ**

Получение бактериальной массы *H. influenzae* тип b.

Очистка КПС *H. influenzae* тип b.

2.1. Первичная очистка (ультрафильтрация) – получение супернатанта бактериальной клеточной среды.

2.2. Обработка ферментами – удаление белков и нуклеиновых кислот.

2.3. Осаждение цетавлоном – получение чистого ПРФ.

3. Контроль качества ПРФ.

##### **Анализ качества образцов ПРФ на разных стадиях**

**очистки методом ВЭЖХ.** Проведено исследование трех образцов ПРФ *H. influenzae* типа b, полученных после каждого этапа очистки. Первый образец – субстанция после ультрафильтрации, второй – субстанция после ферментативной обработки, третий – субстанция после осаждения цетавлоном (конечный продукт). Для удаления солей и прочих компонентов, добавленных в процессе очистки, субстанции диализовали в деионизованной воде и лиофилизировали. Каждый образец ПРФ *H. influenzae* типа b растворяли в пробирке в ФСБ, затем с целью удаления возможных механических примесей вещества центрифугировали. Наличие примесей в каждом образце супернатантов было исследовано в ВЭЖХ на Shodex G-3000. Калибровочную прямую строили с помощью декстранов 270, 70, 50, 10, 5 кДа.

Хроматография полученных образцов показала, что первый образец (вещество после ультрафильтрации) сильно загрязнен побочными низкомолекулярными соединениями, предположительно ЛПС, белками и нуклеиновыми кислотами. Образец при центрифугировании давал осадок. Сам образец (сухой лиофилизат) темно-коричневого цвета, что свидетельствует о возможной примеси хлорида гемина. Его молекулярная масса составляет ~100 кДа (рис. 1А).

Во втором образце (после обработки ферментами) количество примесей заметно уменьшилось. Образец при центрифугировании давал небольшой, но визуально определяемый осадок коричневого цвета, что свидетельствует о возможной примеси хлорида гемина. Его молекулярная масса составляет ~88 кДа (рис. 1Б).

Третий образец (после осаждения цетавлоном) не имел низкомолекулярных примесей, образец при центрифугировании не дает осадка. Сам образец (сухой лиофилизат) белого цвета, что свидетельствует об отсутствии примеси хлорида гемина. Его молекулярная масса составляет ~75 кДа. Пики

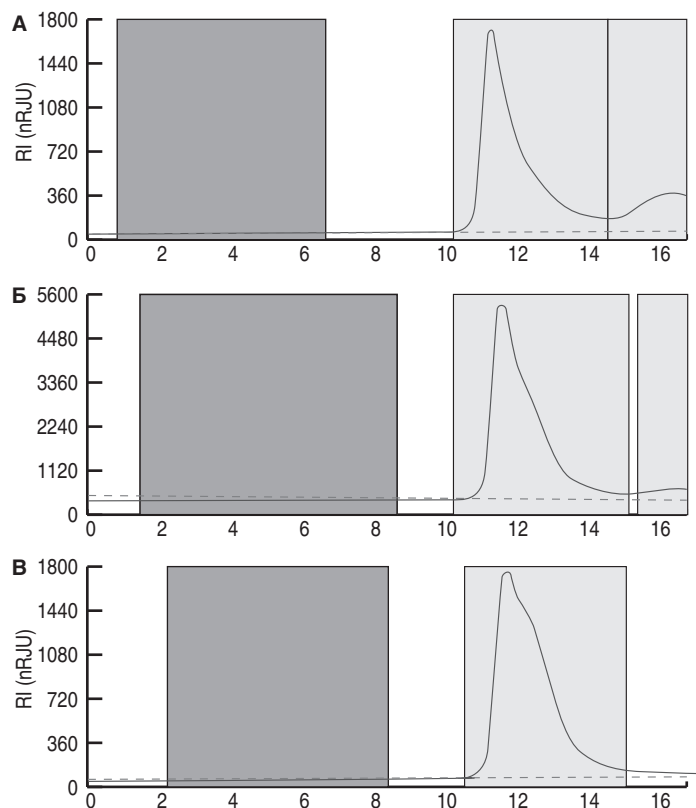


Рис. 1. Хроматограмма образца ПРФ *H. influenzae* типа b: после ультрафильтрации (А), после обработки ферментами (Б), после осаждения цетавлоном (В).

Fig. 1. Chromatogram of *H. influenzae* type b PRP sample: after ultrafiltration (A), after enzyme treatment (B), after precipitation with cetavlon (B).

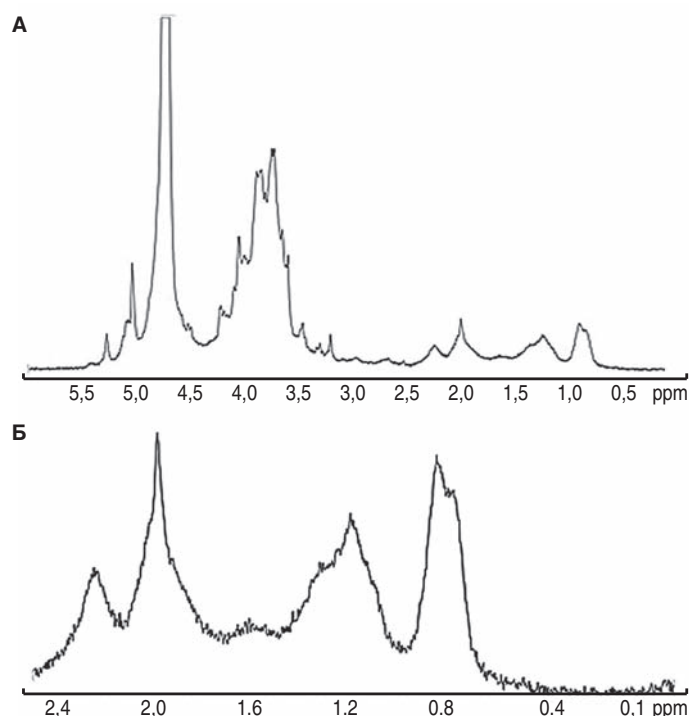


Рис. 2. Протонный ЯМР-спектр образца ПРФ *H. influenzae* типа b после ультрафильтрации: область 6 – 0 ppm (А), область 2,5 – 0 ppm (Б).

Fig. 2. Proton NMR spectrum of a *H. influenzae* type b PRP sample, after the ultrafiltration: region 6 – 0 ppm (A), region 2.5 – 0 ppm (B).

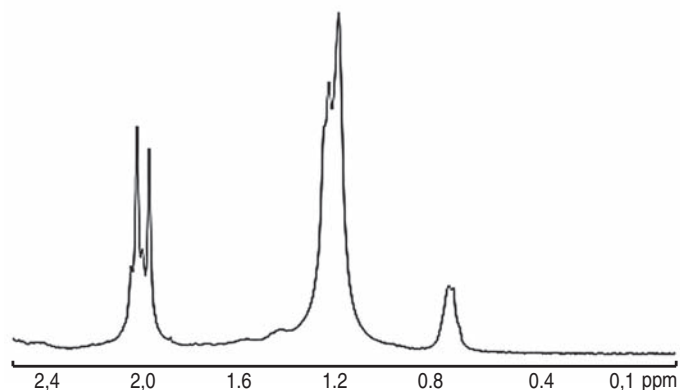


Рис. 3. Протонный ЯМР-спектр липополисахарида *H. influenzae* типа b, область 2,5 – 0 ppm.

Fig. 3. Proton NMR spectrum of *H. influenzae* type b lipopolysaccharide, region 2.5 – 0 ppm.

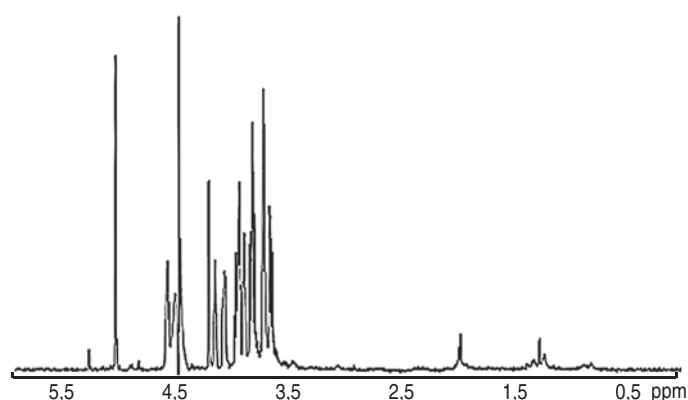


Рис. 4. Протонный ЯМР образца ПРФ *H. influenzae* типа b после обработки ферментами, область 6 – 0 ppm.

Fig. 4. Proton NMR of *H. influenzae* type b PRP sample after enzyme treatment, region 6 – 0 ppm.

после 14-й минуты отсутствуют, следовательно, образец не содержит низкомолекулярных примесей (рис. 1В).

**Съемка и обработка протонных ЯМР-спектров трех образцов КПС *H. influenzae* типа b на различных стадиях очистки.** На протонном спектре первого образца (после ультрафильтрации) (рис. 2А) можно наблюдать наличие аномерного протона в области 5.1 ppm, т.е. можно уверенно утверждать, что данный образец содержит в себе КПС *H. influenzae* типа b. Сам спектр имеет не лучшее «разрешение», или «качество», предположительно потому, что липополисахарид *H. Influenzae* типа b плохо растворяется в воде и «мешает» съемке спектра.

Липополисахарид *H. influenzae* типа b был выделен отдельно, и у него также был снят протонный спектр (рис. 3).

Увеличенная с помощью программы для обработки спектров область от 2,5 до 0 ppm (рис. 2Б) подтверждает, что одно из веществ, которое загрязняет образец ПРФ *H. influenzae* типа b, и есть липополисахарид *H. Influenzae* типа b.

На протонном спектре второго образца можно наблюдать наличие аномерного протона в области 5.1 ppm. Этот спектр лучшего качества по сравнению с первым ввиду удаления основной массы липополисахарида *H. influenzae* типа b. Тем не менее протонный спектр второго образца очевидно отличается от эталонного присутствием посторонних сигналов (рис. 4).

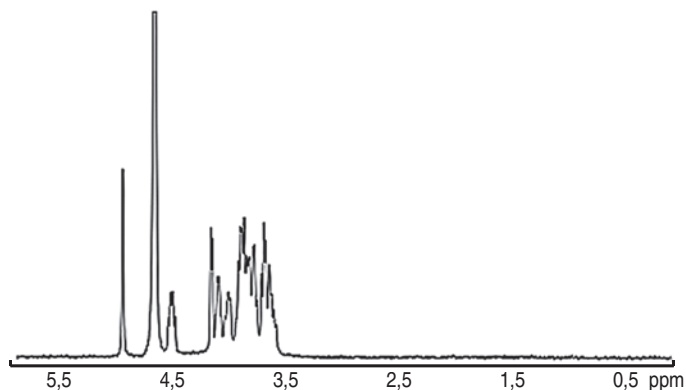


Рис. 5. Протонный ЯМР спектр образца ПРФ *H. influenzae* типа b после осаждения цетавлоном, область 6 – 0 ppm.  
Fig. 5. Proton NMR spectrum of *H. influenzae* type b PRP sample after precipitation with cetavlon, region 6 – 0 ppm.

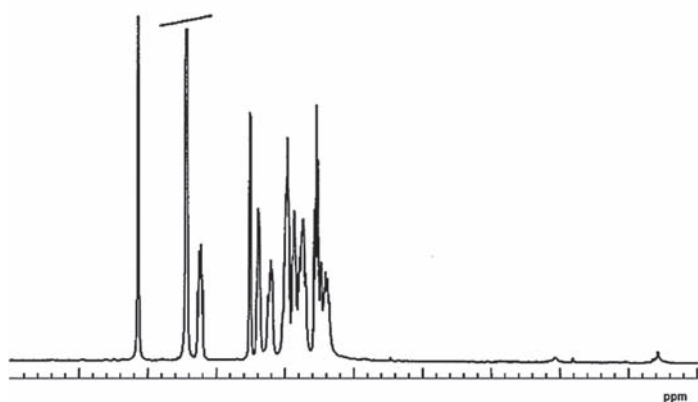


Рис. 6. Эталонный протонный ЯМР-спектр ПРФ *H. influenzae* типа b [14].  
Fig. 6. Reference proton NMR spectrum of *H. influenzae* type b PRP [14].

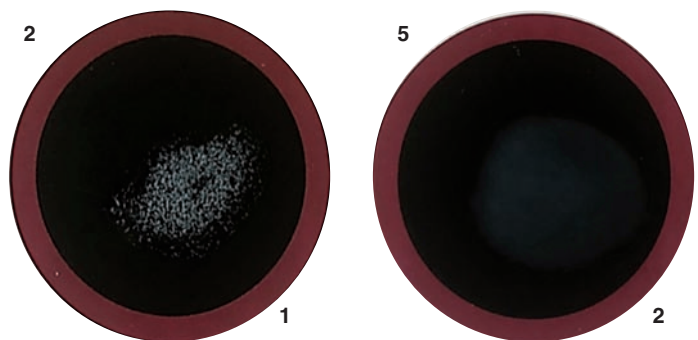


Рис. 7. Результаты реакции агглютинации ПРФ с латексными частицами с сорбированными антителами от 1) иммунных кроликов, 2) интактных кроликов. Набор Wellcogen™ *Haemophilus influenzae* b Rapid Latex Agglutination Test.  
Fig. 7. Results of the PRP agglutination reaction with latex particles with adsorbed antibodies from 1) immune rabbits, 2) intact rabbits. Wellcogen™ *Haemophilus influenzae* b Rapid Latex Agglutination Test Kit.

На протонном спектре третьего образца (после осаждения цетавлоном) можно наблюдать наличие аномального протона в области 5.1 ppm (рис. 5). Спектр третьего образца идеально совпадает с эталонным спектром (рис. 6), т.е. можно уверенно утверждать, что данный образец содержит в себе КПС *H. influenzae* типа b.

#### Анализ очищенного ПРФ *H. influenzae* типа b.

Промежуточные продукты очистки ПРФ содержат большое количество примесей, что следует из результатов ВЭЖХ и ЯМР. Поэтому оценку качества ПРФ проводили только после его финальной очистки, согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) XIV пересмотра.

ПРФ представляет собой полимер, содержащий в своем составе моносахарид рибозу (5-D-ribitol-(1→1)-β-D-рибоза-3-фосфат) [15]. Для количественного определения ПРФ в конъюгате и оценки его качества проводят измерение рибозы. Рибоза составляет примерно 40–41% по весу одиночной повторяющейся цепи ПРФ Hib. Натриевая соль одного повторяющегося звена ПРФ имеет молекулярную массу 368 Да. В реакции Вial рибоза в виде пентозы реагирует с орциноловым реагентом в концентрированном растворе соляной кислоты и хлорида железа с образованием зеленого окрашивания [16, 17]. Эта реакция позволяет обнаружить 3 нмоль рибозы (или мономерного звена ПРФ). В качестве стандартна используется D-рибоза.

В 1 мг конечного продукта содержание рибозы составляло 406,7 мкг. Содержание ПРФ пересчитывается по формуле:

$$(Mr_{\text{ПРФ}}/Mr_{\text{рибозы}}) \times m(\text{полученное значение рибозы}) = (368,14/150,13) \times 406,7 = 997,3.$$

Наличие примесей белка и нуклеиновых кислот исследовалось стандартными методами, принятыми в ГФ РФ XIV: по Бредфорду (для белков) и Спирину (для нуклеиновых кислот). Примеси белков и нуклеиновых кислот в конечном продукте составляли <1% и <1% соответственно, что согласуется с требованиями ГФ РФ XIV.

О присутствии примесей в готовой форме ПРФ можно также судить в биологическом тесте – пирогенности. Подъем температуры у животных при введении свидетельствует о загрязненности вещества эндотоксинами. Суммарный подъем температуры при введении животным составлял 0,6°C, что не превышает порог в 1,2°C и указывает на апиогенность вещества.

Тест на подлинность ПРФ представляет собой положительную реакцию латекс-агглютинации. В основе этого теста лежит взаимодействие ПРФ-специфических антител (полученных от кролика), сорбированных на латексных шариках, и ПРФ с образованием агглютината. Данный тест выполнялся на коммерческом наборе. На рис. 7 представлен результат реакции с очищенным полисахаридом. О специфичности реакции свидетельствует отсутствие агглютинации с отрицательным контролем – латексными частицами с сорбированными антителами от неиммунных животных.

Специфическая активность показывает сохранность антигенных детерминант в препарате. Ее исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) в формате торможения. На твердую фазу сорбировали конъюгат ПРФ *H. influenzae* типа b с БСА. Исследуемый образец в различных концентрациях инкубировали совместно с антителами к ПРФ. Для этого был использован стандартный образец – референсная сыворотка человека, содержащая антитела к ПРФ *H. influenzae* типа b, производства Государственного института биологических стандартов и контроля (Великобритания). Далее реакцию проявляли и снимали зна-

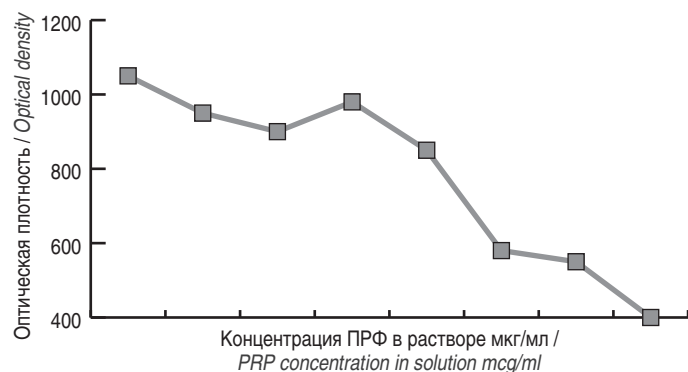


Рис. 8. Реакция торможения в ИФА ПРФ *H. influenzae* типа b со стандартной сывороткой человека, содержащей специфические антитела к *H. influenzae* типа b.

Fig. 8. Inhibition reaction in ELISA of *H. influenzae* type b PRP with standard human serum containing specific antibodies to *H. influenzae* type b.

чения оптической плотности (ОП). В данном тесте при уменьшении концентрации антигена в растворе специфические антитела начинают связываться с антигеном, сорбированным на твердой фазе, что приводит к возрастанию ОП. Как видно из рис. 8, с уменьшением концентрации ПРФ в растворе идет увеличение значений ОП, что говорит о специфическом взаимодействии антител с антигеном (ПРФ) в растворе.

### Обсуждение

Получение ПРФ *H. influenzae* типа b, пригодного для производства вакцинных препаратов, – сложный многоступенчатый процесс. Вакцина против гемофильной инфекции применяется только у малолетних детей, поэтому ее безопасности уделяется особое внимание. ПРФ продуцируется бактериальными клетками в ростовую среду, из которой далее выделяется рядом последовательных этапов очистки, поэтому изначально ПРФ содержит большое количество примесей: компоненты ростовой среды, продукты жизнедеятельности бактерии, белки, нуклеиновые кислоты и т.п. Все эти вещества должны отсутствовать в конечном продукте, как небезопасные для человеческого организма.

Проведенные нами исследования показали, что для получения чистого, пригодного для производства вакцин ПРФ необходимы несколько этапов очистки. Оценка чистоты продуктов после начальных этапов очистки (ультрафильтрация и обработка ферментами) показала значительное присутствие в них примесей. Только после осаждения цетавлоном вещество удовлетворяло всем требованиям, предъявляемым в ГФ РФ XIV: оно не содержало примесей, сохраняло антигенную активность, т.е. не деградировало в процессе очистки и было апиrogenно.

Важными методами контроля ПРФ являются методы ВЭЖХ и протонного ЯМР. Использование этих методов на разных этапах очистки вещества дает представление не только о содержании или отсутствии в нем нежелательных примесей, но и о сохранности его структуры. С помощью ЯМР можно определять также подлинность вещества по совпадению протонного спектра образца и эталона. Согласно ГФ РФ XIV подлинность ПРФ определяется в тесте латекс-

агглютинации, однако данные наборы не выпускаются в России, что может вызывать определенные трудности. Замена иммунохимического метода анализа, предлагаемого ГФ РФ, на физико-химический (протонная ЯМР-спектроскопия) является рентабельной и, возможно, единственной, тем более что тест на подлинность методом протонной ЯМР утвержден в Европейской фармакопее и рекомендован Всемирной организацией здравоохранения [18].

### Заключение

В ходе выполнения работы нами были отработаны методы контроля технологической цепочки получения полисахарида ПРФ грамотрицательной бактерии *H. influenzae* типа b. Получаемый продукт характеризуется высокой степенью очистки и сохранностью антигенных детерминант и может быть использован для конъюгации с белком-носителем для получения полноценного вакцинного препарата против гемофильной инфекции у детей.

### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках научно-производственной программы предприятия «Гритвак».

### Funding information

The work was carried out under scientific and production program of Gritvak LLC.

### 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. World Health Organization: Immunization, Vaccines and Biologicals. Haemophilus influenzae type b (Hib). Available at: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/surveillance\\_type/sentinel/Hib/en/](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/sentinel/Hib/en/) (accessed: 29.01.2018)
2. Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiye M, Carroll K, et al. Invasive serotype a Haemophilus influenzae infections with a virulence genotype resembling Haemophilus influenzae type b: emerging pathogen in the vaccine era? Pediatrics. 2001 Jul;108(1):E18. DOI: 10.1542/peds.108.1.e18
3. Харченко ГА, Кимирилова ОГ. Гемофильная инфекция у детей при sporadicческой заболеваемости: клинические случаи с разным (благоприятным или летальным) исходом. Вопросы современной педиатрии. 2017;16(3):241-245. DOI: 10.15690/vsp.v16i3.1735
4. Gilsdorf JR. Hib Vaccines: Their Impact on Haemophilus influenzae Type b Disease. J Infect Dis. 2021 Sep 30;224(12 Suppl 2):S321-S330. DOI: 10.1093/infdis/jiaa537
5. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Приказ от 6 декабря 2021 г. №1122н об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок. Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202112200070>
6. Avci FY, Kasper DL. How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. Annu Rev Immunol. 2010;28:107-30. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101159

7. Semmes EC, Chen JL, Goswami R, Burt TD, Permar SR, Fouda GG. Understanding Early-Life Adaptive Immunity to Guide Interventions for Pediatric Health. *Front Immunol.* 2021 Jan 21;11:595297. DOI: 10.3389/fimmu.2020.595297
8. Peset Llopis MJ, Harms G, Hardonk MJ, Timens W. Human immune response to pneumococcal polysaccharides: complement-mediated localization preferentially on CD21-positive splenic marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1996 Apr;97(4):1015-24. DOI: 10.1016/s0091-6749(96)80078-9
9. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol.* 2021 Feb;21(2):83-100. DOI: 10.1038/s41577-020-00479-7. Epub 2020 Dec 22. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2021 Jan 5.
10. Sun X, Stefanetti G, Berti F, Kasper DL. Polysaccharide structure dictates mechanism of adaptive immune response to glycoconjugate vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019 Jan 2;116(1):193-198. DOI: 10.1073/pnas.1816401115
11. Елкина СИ, Сергеев ВВ, Ванеева НП, Апарин ПГ, Львов ВЛ, Ястребова НЕ, и др. Штамм *Haemophilus influenzae* В МЕЧ №1 – продуцент капсульного полисахарида – полирибозилрибитолфосфата. Пат. 2257412. Рос. Федерация №2004109822/13; заявл. 01.04.2004; опубл. 27.07.2005, Бюл. №21.
12. Kuo J-C. Isolation and purification of polyribozyl ribitol phosphate from *Haemophilus influenzae* type b. US4220717 (A) – 1980-09-02. Available at: [https://www.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=19800902&DB=EPODOC&locale=ru\\_RU&CC=US&NR=4220717A&KC=A&ND=5](https://www.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=19800902&DB=EPODOC&locale=ru_RU&CC=US&NR=4220717A&KC=A&ND=5)
13. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание. Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14?ysclid=Ihq9bpdizl521818070>
14. Lemercinier X, Jones C. An NMR spectroscopic identity test for the control of the capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae* type b. *Biologicals.* 2000 Sep;28(3):175-83. DOI: 10.1006/biol.2000.0255
15. Crisel RM, Baker RS, Dorman DE. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. *J Biol Chem.* 1975 Jul 10;250(13):4926-30. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41257-X
16. Ashwell G. Colorimetric Analysis of Sugar. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in Enzymology.* Vol. 3. 1957; 73-105.
17. Kabat EA, Mayer M. Carbohydrate estimation. In: *Experimental immunochemistry.* Springfield, IL: C Thomas; 1961; 526e37.
18. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series. №897, 2000. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/hib-conjugate-vaccines-annex-1-trs-no-897>
19. provedeniya profilakticheskikh privivok. Available at: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202112200070> (In Russian).
20. Avci FY, Kasper DL. How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:107-30. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101159
21. Semmes EC, Chen JL, Goswami R, Burt TD, Permar SR, Fouda GG. Understanding Early-Life Adaptive Immunity to Guide Interventions for Pediatric Health. *Front Immunol.* 2021 Jan 21;11:595297. DOI: 10.3389/fimmu.2020.595297
22. Peset Llopis MJ, Harms G, Hardonk MJ, Timens W. Human immune response to pneumococcal polysaccharides: complement-mediated localization preferentially on CD21-positive splenic marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1996 Apr;97(4):1015-24. DOI: 10.1016/s0091-6749(96)80078-9
23. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol.* 2021 Feb;21(2):83-100. DOI: 10.1038/s41577-020-00479-7. Epub 2020 Dec 22. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2021 Jan 5.
24. Sun X, Stefanetti G, Berti F, Kasper DL. Polysaccharide structure dictates mechanism of adaptive immune response to glycoconjugate vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Jan 2;116(1):193-198. DOI: 10.1073/pnas.1816401115
25. Elkina SI, Sergeev VV, Vaneeva NP, Aparin PG, L'vov VL, Yastrebova NE, i dr. Shtamm *Haemophilus influenzae* B MECH №1 – produtsent kapsul'nogo polisakharida – poliribozilribitolfosfa-ta. Pat. 2257412. Ros. Federatsiya №2004109822/13; zayavl. 01.04.2004; opubl. 27.07.2005, Byul. N21. (In Russian).
26. Kuo J-C. Isolation and purification of polyribozyl ribitol phosphate from *Haemophilus influenzae* type b. US4220717 (A) – 1980-09-02. Available at: [https://www.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=19800902&DB=EPODOC&locale=ru\\_RU&CC=US&NR=4220717A&KC=A&ND=5](https://www.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=19800902&DB=EPODOC&locale=ru_RU&CC=US&NR=4220717A&KC=A&ND=5)
27. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii, XIV izdanie. Available at: <https://femb.ru/record/pharmacopea14?ysclid=Ihq9bpdizl521818070> (In Russian).
28. Lemercinier X, Jones C. An NMR spectroscopic identity test for the control of the capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae* type b. *Biologicals.* 2000 Sep;28(3):175-83. DOI: 10.1006/biol.2000.0255
29. Crisel RM, Baker RS, Dorman DE. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. *J Biol Chem.* 1975 Jul 10;250(13):4926-30. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41257-X
30. Ashwell G. Colorimetric Analysis of Sugar. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in Enzymology.* Vol. 3. 1957;73-105.
31. Kabat EA, Mayer M. Carbohydrate estimation. In: *Experimental immunochemistry.* Springfield, IL: C Thomas; 1961;526e37.
32. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series. №897, 2000. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/hib-conjugate-vaccines-annex-1-trs-no-897>

## References

1. World Health Organization: Immunization, Vaccines and Biologicals. *Haemophilus influenzae* type b (Hib). Available at: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/surveillance\\_type/sentinel/Hib/en/](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/sentinel/Hib/en/) (accessed: 29.01.2018)
2. Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiyyeh M, Carroll K, et al. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatrics.* 2001 Jul;108(1):E18. DOI: 10.1542/peds.108.1.e18
3. Kharchenko GA, Kimirilova OG. *Haemophilus influenzae* infection in children during sporadic morbidity: clinical cases with different (favorable or fatal) outcomes. *Current Pediatrics.* 2017;16(3):241-245. DOI: 10.15690/vsp.v16i3.1735 (In Russian).
4. Gilsdorf JR. Hib Vaccines: Their Impact on *Haemophilus influenzae* Type b Disease. *J Infect Dis.* 2021 Sep 30;224(12 Suppl 2):S321-S330. DOI: 10.1093/infdis/jiaa537
5. Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii. Prikaz ot 6 dekabrya 2021 g. №1122n ob utverzhenii natsional'nogo kalendarya profilakticheskikh privivok, kalendarya profilakticheskikh privivok po epidemicheskim pokazaniyam i poryadka

## Информация о соавторах:

Стряхнин Пётр Алексеевич, лаборант лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Курбатова Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории препаративной биохимии антигенов ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Казakov Игорь Александрович, начальник производственного участка №1 ООО «Гритвак»

Разваляева Надежда Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной технологии иммунопрепаратов ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Анкудинов Игорь Веналиевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Ганчо Татьяна Венальевна, младший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Ледов Владимир Алексеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Апарин Пётр Геннадьевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

**about co-authors:**

Petr A. Stryakhnin, technician, laboratory of polysaccharide vaccines, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Irina Yu. Kurbatova, PhD, senior scientist, laboratory of antigen preparative biochemistry, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Igor A. Kazakov, Head of Production site No 1, Gritvak LLC

Nadezhda A. Razvalyayeva, junior Researcher Laboratory of Immunopreparation Experimental Technology, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Igor V. Ankudinov, PhD, senior scientist, laboratory of polysaccharide vaccines, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Tatiana V. Gancho, junior researcher, laboratory of polysaccharide vaccines, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Vladimir A. Ledov, PhD, leading scientist, laboratory of polysaccharide vaccines, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Petr G. Aparin, PhD, head of polysaccharide vaccines laboratory, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

## НОВОСТИ НАУКИ

### Характеристика гипервирулентных мультиантибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* у стационарных пациентов с тяжелым течением COVID-19

Тяжелое течение заболевания COVID-19 у стационарных пациентов обусловлено комплексом причин, в том числе развитием вирусно-бактериальных ко-инфекций. Эмпирическое назначение антибиотиков наряду со сниженным инфекционным контролем способствует эпидемическому распространению микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью. Наиболее часто выявляемыми бактериальными патогенами при нозокомиальных инфекциях являются бактерии *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазу. Значительное распространение указанные штаммы получили в период пандемии новой коронавирусной инфекции.

**Цель.** Представить фенотипическую и генетическую характеристику штаммов *K. pneumoniae*, как доминирующего патогена у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии с тяжелым течением COVID-19.

**Пациенты и методы.** 38 человек, из них 6 – имеющие тяжелое течение COVID-19, находившихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии инфекционных клинических больниц Санкт-Петербурга и Москвы с июля 2020 г. по декабрь 2020 г. Все пациенты подписывали добровольное согласие на проведение диагностических исследований, данные о больных анонимизированы. Биоматериал: мокрота, бронхоальвеолярная лаважная жидкость, мазок из носоглотки. Методы исследования: бактериологическая идентификация бактериальных штаммов, тестирование на чувствительность к противомикробным препаратам, полногеномное секвенирование штаммов *K. pneumoniae*.

**Результаты.** Геномы большинства штаммов *K. pneumoniae*, выделенные от больных с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции, содержали кластеры генов аэробактерина и энтеробактерина. Однако некоторые, а именно геномы штаммов 90 и 124, кроме них, содержали кластеры генов иерсиниабактина. Эти гены являются маркерами высокой вирулентности и способности к образованию биопленок. Изученные штаммы отнесены к четырем типам последовательностей (ST874, ST395, ST147, ST15), которые характеризуются высокой вирулентностью и антибиотикорезистентностью. Наличие указанных штаммов *K. pneumoniae* можно рассматривать в качестве одного из ведущих причинных факторов развития тяжелых и летальных форм COVID-19.

**Заключение.** Данные нашего наблюдения демонстрируют рост показателя выявляемости патогена – *K. pneumoniae* – с 30 до 70% у пациентов с COVID-19 в течение пандемического периода. При этом более 80% штаммов были полирезистентны в фенотипических тестах к большинству антибиотиков, используемых в стратегиях терапии осложненного течения COVID-19. Сочетание гипервирулентности и антибиотикорезистентности имеет определяющее значение в распространении подобных штаммов в стационаре и их влиянии на исход заболевания. Появление гиперрезистентных патогенов подчеркивает необходимость проведения регулярного эпидемиологического мониторинга и строгих мер инфекционного контроля в стационарах России, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии.

Гончаров А.Е., Азаров Д.В., Мохов А.С., Почтовый А.А., Кустова Д.Д., Гушин В.А., Лебедева Е.А., Колодziejewa В.В., Киреева А.Г., Краева Л.А., Долинный С.В., Бургасова О.А., Гончарова А.Р., Белькова Е.И., Дмитриев А.В.  
Инфекционные болезни. 2022; 20(2): 33–40. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-2-33-40

Источник: <https://www.phdynasty.ru>