

Получение кроличьих гипериммунных сывороток к *Haemophilus influenzae*

Я.Б.Нескородов¹, Я.В.Мишуткина¹, С.Г.Марданлы^{1,2}

¹ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск, Российская Федерация;

²ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», Орехово-Зуево, Российская Федерация

Представлены актуальные данные о заболеваемости, вызванной *Haemophilus influenzae*, и проблемах диагностики. Описаны подходы и результаты получения кроличьих гипериммунных сывороток к *H. influenzae*.

Ключевые слова: *Haemophilus influenzae*, гипериммунная сыворотка, агглютинация

Для цитирования: Нескородов Я.Б., Мишуткина Я.В., Марданлы С.Г. Получение кроличьих гипериммунных сывороток к *Haemophilus influenzae*. Бактериология. 2020; 5(4): 35–38. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-35-38

Obtaining bunny hyperimmune serum for *Haemophilus influenzae*

Ya.B.Neskorodov¹, Ya.V.Mishutkina¹, S.G.Mardanly^{1,2}

¹CJSC «EKOLab», Elektrogorsk, Russian Federation;

²State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuevo, Russian Federation

This brief report describes the approaches and results of obtaining rabbit hyperimmune sera for *Haemophilus influenzae*.

Key words: *Haemophilus influenzae*, hyperimmune serum, agglutination

For citation: Neskorodov Ya.B., Mishutkina Ya.V., Mardanly S.G. Obtaining bunny hyperimmune serum for *Haemophilus influenzae*. Bacteriology. 2020; 5(4): 35–38. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-35-38

Гемофильная палочка (*Haemophilus influenzae*) представляет собой неподвижные грамтрицательные плеоморфные коккобациллы, покрытые оболочкой. Данная бактерия может выделяться как в капсульных, так и в бескапсульных формах. Бактерия способна продуцировать эндотоксин, который представляет собой липополисахарид клеточной стенки. Исходя из химического строения и антигенных свойств полисахаридной капсулы, выделяют 6 серотипов *H. influenzae*: A, B, C, D, E, F.

От 90 до 95% населения являются носителями данной бактерии [1], а у 5% из них высевается вирулентный штамм серогруппы В. Этот штамм способен вызывать различные формы инфекций (ХиБ-инфекции), которыми поражаются преимущественно дети до 4 лет. Инфекции бывают как локализованные (например, отит, остеомиелит, артрит и т.п.), так и генерализованные (например, септицемия, менингит, эпиглотит и т.д.). Также встречаются и относительно редкие формы гемофильной инфекции: перитонит, гепатит, уретрит. Несмотря на наличие высокоэффективных антибакте-

риальных препаратов, уровень смертности при инфекции гемофильной палочки может достигать 11% [2, 3].

Наблюдения показывают, что с 1996 г. количество случаев ХиБ-инфекции увеличилось в три раза [4], однако из-за сравнительной редкости данного заболевания настороженность врачей по данному поводу низкая, что является одной из причин сложной диагностики [1]. Развитие болезни при ХиБ-инфекции протекает тяжело: у каждого третьего пациента с эпиглоттитом развивалась пневмония и трахеобронхит, а каждый четвертый больной, в связи с угрозой асфиксии, нуждался в продлении назотрахеальной интубации [4].

Особенно тяжелые формы ХиБ-инфекция приобретает в условиях гнойного бактериального менингита, который может встречаться в разных возрастных группах. Летальность этого заболевания чрезвычайно высока: даже при наличии своевременного начатого лечения показатель смертности может достигать до 26%.

Диагностика ХиБ-инфекции осуществляется микробиологическим лабораторным исследованием с применением

Для корреспонденции:

Нескородов Ярослав Борисович, кандидат биологических наук, старший микробиолог НПО «Иммунология» ЗАО «ЭКОлаб»

Адрес: 142530, Московская область, г. Электрогорск, ул. Буденного, 1
E-mail: ekolab_neisseria@mail.ru

For correspondence:

Yaroslav B. Neskorodov, PhD (Biological Sciences), Senior Microbiologist at the Scientific and Production Association «Immunology», CJSC «EKOLab»

Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
E-mail: ekolab_neisseria@mail.ru

метода посева со слизистой на «шоколадный» агар и последующим серологическим анализом [4]. Для данной процедуры традиционно используют метод посева микроорганизмов из цереброспинальной жидкости пациентов. Данный подход является «золотым стандартом» диагностики данной инфекции, однако он имеет ряд серьезных ограничений. Во-первых, данный метод чрезвычайно чувствителен к наличию антибактериальной терапии на догоспитальном этапе: наличие такой терапии значительно снижает шансы получить пригодные для анализа бактериальные колонии. Во-вторых, для правильной работы метода необходимо точно соблюдать правила забора и транспортировки материала и условия культивирования проб (не менее 48 ч) [1].

Следует учитывать, что *H. influenzae* требовательна к условиям культивирования. Невозможно получить стабильный рост культуры, если в ней отсутствуют такие факторы роста, как гемин (фактор X) и никотинамидадениндинуклеотид (НАД, или фактор V) [5].

Из-за низкой настороженности врачей относительно инфекции гемофильной палочки и трудоемкой процедуры лабораторной диагностики подобных заболеваний актуальной становится разработка «некультуральных» методов идентификации гнойного бактериального менингита, таких как диагностика на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), И-ПЦР-диагностика и метод латекс-агглютинации [6].

Различные варианты метода диагностики бактериальной инфекции на основе ПЦР являются чрезвычайно точными и информативными, однако данный подход невозможно осуществить в полевых условиях непосредственно у постели больного, так как для этого требуется целый комплекс оборудования и высококвалифицированный персонал. На этом фоне разработка и применение диагностических наборов на основе латексных частиц представляется наиболее оправданной стратегией, поскольку для проведения диагностических мероприятий с применением этого метода медработник не должен обладать каким-либо специализированным оборудованием, а взятие образцов у пациента методом пункции входит в сферу его профессиональных знаний.

Диагностические наборы на основе латексных частиц представляют собой суспензии сферических полистирольных латексных частиц различного диаметра (0,81...1 мкм), покрытых специфическими антителами к гемофильной палочке. Размер латексных сфер важен для производства диагностических наборов, так как при использовании суспензий с частицами минимального размера усложняется процедура визуального учета реакции, а применение сфер максимального размера существенно увеличивает частоту неспецифических реакций.

Суть метода латексной агглютинации заключается в том, что частицы латекса, покрытые антителами, агглютинируют в присутствии бактериальных антигенов, содержащихся в цереброспинальной жидкости пациента. Агглютинат хорошо виден невооруженным глазом. При отрицательных результатах реакции суспензия латекса остается гомогенно-мутной, без глыбок агглютината и участков просветления. Проведение данного анализа занимает приблизительно 10 мин, а сам механизм реакции не требует наличия живых бактерий или их ДНК в образцах [7].

Важным этапом в производстве диагностических наборов на основе полистирольных латексов является получение специфических антител. Для сенсibilизации частиц латекса пригодны гипериммунные сыворотки, полученные при иммунизации лабораторных животных. Повышению специфичности реакции латексной агглютинации и уменьшению числа ложноположительных и перекрестных реакций способствует применение очищенных иммуноглобулиновых фракций.

Гипериммунные, или специфические, сыворотки представляют собой сыворотки крови животных, систематически иммунизированных бактериальными антигенами. Гипериммунные сыворотки содержат антитела, которые обладают специфическим сродством к бактериальным токсинам, бактериям или вирусам, против которых были иммунизированы животные.

Целью данной работы было получение гипериммунных кроличьих сывороток к *H. influenzae* серогруппы В с выраженной реакцией агглютинации к соответствующим серотипам возбудителя.

Материалы и методы

Работы по получению антигенов, бактериальных сорбентов для удаления гетерологичных антител проводились с соблюдением требований асептики в боксах ламинарных шкафов [8]. Музейные культуры производственных штаммов *H. influenzae* хранились при -70...-80°C в криобирках.

В компании ЗАО «ЭКОлаб» для получения кроличьих гипериммунных сывороток к гемофильной палочке серотипов А, В, С, D, E, F использовали бактериальные штаммы, полученные из Уникальной научной установки «Коллекция Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова». Культивирование штаммов производилось на «шоколадном» агаре собственного производства с применением бараньей крови. Бактериальную массу для производства вакцины наращивали на чашках Петри. Смыв бактериальной культуры производили физиологическим раствором. Сыворотку обеззараживали формалином. Очистку бактериальной культуры от формалина проводили методом повторного центрифугирования и отмывки бактериальной массы стерильным физиологическим раствором. Полученную бактериальную массу разбавляли, ориентируясь по стандарту мутности, и хранили в замороженном состоянии. Контроль серологического профиля полученной вакцины осуществляли с помощью коммерческих диагностических наборов *H. influenzae* компании SSI Diagnostica (www.ssidagnostica.com/), Дания.

Для восстановления бактерий из замороженного состояния использовали теплую (37°C) питательную среду – бульон Хоттингера. Процедура восстановления была следующая: криобирку снаружи обрабатывали дезинфицирующим средством (спирт 70%) и помещали в асептические условия ламинарного бокса. Через 5 мин пробирку вскрывали с соблюдением правил асептики. Прокаленным над пламенем спиртовки и охлажденным пинцетом извлекали 2–3 «бусины» и переносили их в 2 мл теплого бульона Хоттингера. В жидком бульоне бактерии культивировали в течение 12 ч. После этого жидкую бактериальную культуру наносили на шоколадный агар (по 200 мкл) и равномерно распределяли по поверхности среды с помощью шпателя Дригальского. На шоколадном

агаре культивирование бактерий продолжалось в течение 24 ч, после чего полученные бактериальные колонии смывали физиологическим раствором и формализировали.

Длительность процесса обеззараживания бактериального смыва формалином составляла 24 ч. Очистку от раствора формалина осуществляли центрифугированием. Центрифугирование проводили в стерильных емкостях при 2000 об./мин в течение часа. Всю надосадочную жидкость удаляли, а оставшийся плотный осадок кремового цвета разбавляли физиологическим раствором до мутности, соответствующей 100 млрд микробных тел в 1 мл. Для получения требуемой мутности использовали соответствующие стандарты мутности.

Животные (кролики) содержались в виварии компании ЗАО «ЭКОлаб» согласно действующим в РФ нормам содержания лабораторных животных [9].

Животных вакцинировали 1 мл вакцины в холку по схеме «7 через 7», где между инъекциями допускается временной промежуток в 6–7 дней, а количество инъекций равно семи.

После вакцинирования животные находились под наблюдением. В случае выявления каких-либо отклонений (снижение подвижности, кожные поражения, различные выделения и т.д.) животных выбраковывали. Животные содержались индивидуально. Каждая клетка была снабжена биркой, на которой указывалась информация о партии кроликов, антигене, календаре иммунизаций. Тотальный забор крови у животных проводился по утвержденной процедуре [10].

Собранную кровь животных фракционировали. Прозрачную часть сыворотки сливали в стерильные флаконы, а мутную – центрифугировали. Фракцию над осадком объединяли с прозрачной частью сыворотки. Консервацию сыворотки проводили хлороформом.

Одноименные сыворотки, полученные от различных животных, объединяли в серию. Объединенной серии, прошедшей контроль, присваивали номер серии.

Серийная сыворотка проходила процедуру фильтрующей стерилизации. Перед фильтрацией сыворотки повторно центрифугировали для осаждения механических частиц и взвеси осадка денатурированного белка. Фильтрацию осуществляли в ламинарном шкафу в асептических условиях. При завершении процедуры фильтрации осуществляется контроль pH сыворотки, который должен быть в диапазоне от 7,0 до 7,5. В случае отклонения от заданного диапазона сыворотка бракуется. Если в результате проверки выявляли бактериальную зараженность полученного раствора, то допускали его повторную фильтрацию.

Результаты и обсуждение

В настоящее время были получены гипериммунные кроличьи сыворотки к *H. influenzae* серогруппы В, демонстрирующие выраженную реакцию агглютинации к соответствующим серотипам. Выраженная реакция агглютинации сохранялась при разведении нативной сыворотки 1:512.

В нашей работе мы отмечаем сложность при создании гипериммунных кроличьих сывороток к *H. influenzae*, выразившуюся в слабой реакции агглютинации и зависимости интенсивности формирования хлопьев от серогруппы бактерий. Так, например, в нашей работе было показано, что наиболее выраженная реакция агглютинации

происходит с бактерией серогруппы В, а с серогруппами А и Е, несмотря на то, что вакцинация проводилась в одинаковых контролируемых условиях, реакция агглютинации была слабо выражена и не могла в полной мере применяться для диагностики. Создание латексных диагностических систем может быть решением данной проблемы.

В настоящее время из полученных гипериммунных сывороток были экстрагированы и очищены иммуноглобулиновые фракции. Проводятся работы по получению диагностических наборов на основе полистирольных латексов.

Информация о финансировании

Финансирование работы проводилось из собственных средств компании.

Financial support

The work was financed from the company's own funds.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Кашуба ЭА, Рычкова ОА, Дроздова ТГ, Булаева ТИ, Петров ВГ, Кухтерин АА, Прыкина ОВ. Сепсис, вызванный *Haemophilus influenzae* типа В. Детские инфекции. 2003;4:54-6.
2. Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. N Engl J Med. 1997 Oct 2;337(14):970-6. DOI: 10.1056/NEJM199710023371404
3. Wenger JD, Hightower AW, Facklam RR, Gaventa S, Broome CV. Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study. The Bacterial Meningitis Study Group. J Infect Dis. 1990 Dec;162(6):1316-23. DOI: 10.1093/infdis/162.6.1316
4. Гоева СВ, и др. О целесообразности вакцинации против *Haemophilus influenzae* типа В. Вопросы современной педиатрии. 2006;S.
5. Herbert MA, Hood DW, Moxon ER (ed.). *Haemophilus influenzae* protocols. – Springer Science & Business Media, 2003.
6. Баркова ИА, Барков АМ, Викторов ДВ. Метод иммуно-ПЦР в диагностике бактериальных и вирусных инфекций. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019;3:110-17. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-3-110-117
7. Нартов ПВ, Попов ОИ. Окружающая среда как фактор развития гнойных бактериальных менингитов. Довкілля та здоров'я. 2007;4 (43).
8. Марданлы СГ, Симонов ВВ, Авдонина АС. Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами. Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ; 2017, 208 с.
9. Марданлы СГ, Киселёва ВА, Мишуткина ЯВ. Содержание и использование животных-продуцентов биологического сырья. Монография. Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ; 2019, 88 с.
10. Полоз АИ, Финогенов АЮ. Методические указания по гуманной эвтаназии животных. Минск: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского»; 2008.

References

1. Kashuba EA, Rychkova OA, Drozdova TG, Bulaeva TI, Petrov VG, Kukhterin AA, Pryakhina OV. Sepsis, vyzvannyi *Haemophilus influenzae* tipa B. Children's Infections. 2003;4:54-6.

2. Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med.* 1997 Oct 2;337(14):970-6. DOI: 10.1056/NEJM199710023371404

3. Wenger JD, Hightower AW, Facklam RR, Gaventa S, Broome CV. Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study. The Bacterial Meningitis Study Group. *J Infect Dis.* 1990 Dec;162(6):1316-23. DOI: 10.1093/infdis/162.6.1316

4. Goeva SV, et al. O tselesoobraznosti vaktsinatsii protiv *Haemophilus influenzae* tipa V. *Current Pediatrics (Voprosy Sovremennoi Pediatrii).* 2006;S.

5. Herbert MA, Hood DW, Moxon ER (ed.). *Haemophilus influenzae* protocols. – Springer Science & Business Media, 2003.

6. Barkova IA, Barkov AM, Viktorov DV. Method of immuno-PCR in diagnostics of bacterial and viral infections. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2019;3:110-17. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-3-110-117

7. Nartov PV, Popov OI. Okruzhayushchaya sreda kak faktor o razvitiy gnoinykh bakterial'nykh meningitov. *Довкілля та здоров'я.* 2007;4 (43).

8. Mardanly SG, Simonov VV, Avdonina AS. Proizvodstvo naborov reagentov dlya klinicheskoi laboratornoi diagnostiki immunokhimicheskimi metodami. Orekhovo-Zuevo: Editorial and publishing Department of the University; 2017, 208 p.

9. Mardanly SG, Kiseleva VA, Mishutkina YaV. Soderzhanie i ispol'zovanie zhivotnykh-produtsentov biologicheskogo syr'ya. Orekhovo-Zuevo: Editorial and publishing Department of the University; 2019, 88 p.

10. Poloz AI, Finogenov AYu. Metodicheskie ukazaniya po gumannoi evtanazii zhivotnykh. Minsk: RUP «Institut eksperimental'noi veterinarii im. S.N.Vyshelesskogo; 2008.

Информация об авторах:

Мишуткина Яна Владимировна, кандидат биологических наук, директор НПО «Иммунология» ЗАО «ЭКОлаб»
 Адрес: 142530, Московская область, Электрогорск, ул. Буденного, 1
 E-mail: ekolab-mishutkina@mail.ru

Мардалы Сейфаддин Гашимович, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет»
 Адрес: 142611, Орехово-Зуево, ул. Зеленая, 22
 Телефон: (49643) 3-17-45
 E-mail: ekolab-sekretar@mail.ru

Information about authors:

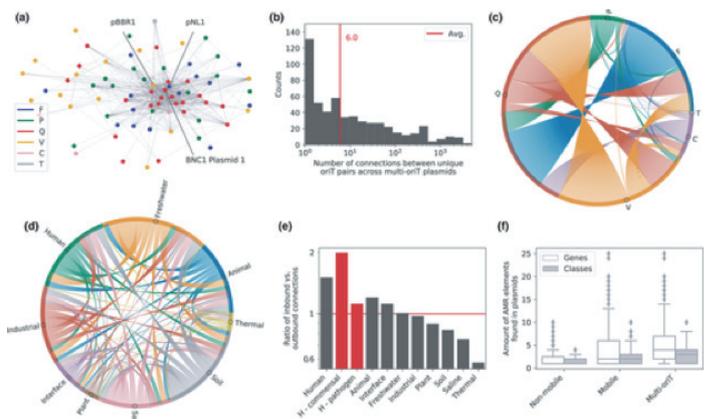
Yana V. Mishutkina, PhD (Biological Sciences), Director of at the Scientific and Production Association «Immunology» CJSC «EKOLab»
 Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
 E-mail: ekolab-mishutkina@mail.ru

Seifaddin G. Mardanly, MD, PhD, DSc, professor, academician AMTS, professor of the department of pharmacology, State University of Humanities and Technology
 Address: 22 Zelenaya str., Orekhovo-Zuevo, Moscow region, 1142611 Russian Federation
 Phone: (49643) 3-17-45
 E-mail: ekolab-sekretar@mail.ru

НОВОСТИ НАУКИ

Бактерии становятся устойчивыми к антибиотикам намного быстрее, чем мы думаем

Устойчивость к противомикробным препаратам представляет большую опасность для человечества, отчасти из-за широко распространенного горизонтального переноса генов плазмид посредством конъюгации. Для раскрытия основ переноса резистентности и для разработки прогнозных мер по ограничению распространения резистентности необходимо моделирование переноса плазмиды. Однако главным ограничением в современном понимании плазмид является неполная характеристика механизмов переноса конъюгативной ДНК, которая скрывает реальный потенциал переноса плазмид в природе. Предполагается, что субстраты плазмидного происхождения кодируют определенные структурные свойства ДНК, которые могут облегчить обнаружение этих областей в больших наборах данных, и разработать процедуру выравнивания на основе структуры ДНК для типирования субстратов переноса, которая превосходит подходы, основанные на последовательностях. Выявлены тысячи предполагаемых субстратов для переноса ДНК, что показывает, что подвижность плазмид может быть в два раза выше и охватывать почти в два раза больше видов хозяев, чем это известно в настоящее время. Более половины всех предполагаемых мобильных плазмид содержат средства для мобилизации с помощью систем конъюгации, принадлежащих к разным мобильным группам, которые могут гипотетически связывать ранее ограниченные диапазоны хозяев в экологических средах обитания в надежную сеть переноса плазмид. Обнаружено, что эта гипотетическая сеть способствует передаче устойчивости к противомикробным препаратам от генетических резервуаров окружающей среды к патогенам человека, что может быть важным фактором наблюдаемого быстрого развития устойчивости у людей и, таким образом, важным направлением будущих профилактических мер.



Zrimec J. Multiple plasmid origin-of-transfer regions might aid the spread of antimicrobial resistance to human pathogens. Microbiologypen. 2020 Dec;9(12):e1129. DOI: 10.1002/mbio3.1129