

© Деркач С. А., Куцай Н. М., Городницька Н. І., Скляр Н. І., 2023
УДК 619.94:615.371
DOI 10.11603/1681-2727.2023.1.13923

С. А. Деркач, Н. М. Куцай, Н. І. Городницька, Н. І. Скляр

ПРОТЕКТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ЗРАЗКІВ СИНЬОГНІЙНОЇ АВТОВАКЦИНИ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України»

Мета роботи – підвищення протективних властивостей синьогнійної автовакцини, отриманої фотодинамічним способом за удосконаленою технологією.

Матеріали і методи. Для експериментів були задіяні 170 білих безпородних мишей масою 18-20 г. Ефективність вакцинації оцінювали за показниками LD_{50} , визначених для дослідної (вакциновані) та контрольної (невакциновані) груп тварин, з розрахунком індексу ефективності (IE): відношення LD_{50} дослідне до LD_{50} у контролі.

Результати досліджень. Встановили, що автовакцина нетоксична та неалергенна. При вивченні протективної активності отриманих вакцинних зразків через один тиждень після вакцинації мишей заражали внутрішньочеревинно гомологічним штамом *P. aeruginosa* в дозі 5×10^9 мікробних клітин, що відповідало $5LD_{50}$.

Таку ж дозу культури вводили неімунізованим мишам – контрольна група. В цій групі вже протягом перших п'яти діб загинуло близько 60 % тварин, а за весь період нагляду (15 діб) цей показник зростав до 80 %.

Імунізація мишей розробленою автовакциною дозволила достовірно знизити летальність ($\chi^2 < 0,05$), яка не перевершувала 20 %. У групах піддослідних тварин, навіть при їх загибелі, вдавалося продовжити їх життя до 10-15 днів.

Результати порівняльного вивчення 3 серій автовакцин показали, що всі вони давали достовірно позитивний ефект, порівняно з контрольною групою мишей ($\chi^2 > 0,05$, $p < 0,01$).

Висновок. Отримані результати досліджень свідчать про ефективність застосування розробленої технології отримання синьогнійних вакцин та їх протективну активність. Це вказує на перспективність впровадження автовакцинотерапії у практику охорони здоров'я, що є особливо важливим в період воєнного стану.

Ключові слова: синьогнійна інфекція, автовакцина, фотодинамічна інактивація збудника, протективність вакцини.

Інфекції, які зумовлені умовно-патогенними мікроорганізмами (УПМ), є стрімко зростаючою загрозою в результаті швидкого формування антибіотикорезистентності як серед нозокоміальних, так і серед позалікарняних штамів. *P. aeruginosa*, поряд зі *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, входять у четвірку лідерів бактерій, які переважно виявлялися при бойових травмах [1, 2].

Говорячи про ранові інфекції, слід зазначити, що цей інфекційний процес нерідко характеризується етіологічною поліморфністю, тож визначити провідну роль окремого збудника буває досить складно. Гнійно-запальні захворювання, зумовлені синьогнійною паличкою, характеризуються тяжким перебігом, інтоксикацією, розвитком септичного шоку, високою летальністю, тому дослідження розробки імунобіологічних засобів спрямованої дії проти *P. aeruginosa* є актуальними і соціально та економічно обґрунтованими [3-5].

Пошук підходів до створення імунних препаратів триває в різних країнах [6-8]. Особливо актуальним залишається пошук такого способу отримання вакцин, який би дозволив мінімізувати ризики та забезпечував збереження специфічності та імуногенності препарату [9, 10]. Найбільш перспективним напрямком лікування та профілактики таких мінливих інфекційних патологій, як псевдомонози, є персоніфікація вакцинації через технології швидкого виготовлення автовакцин [11-14].

Автовакцини готують зі штаму, вилученого від конкретного хворого, і застосовують для його лікування. Можливо включення до такого препарату антигенів декількох аналогічних штамів – збудників або декількох видів умовно-патогенних мікроорганізмів, які циркулюють у певних закритих колективах, в реанімаційних відділеннях, опікових центрах, військових госпіталях тощо.

Такі «локальні» вакцинні препарати можуть бути ефективними як для лікування, так і для профілактики спалахів захворювань, для санації осередків внутрішньолікарняних інфекцій.

Автовакцинація показана для лікування хронічних, рецидивних, локальних або генералізованих захворю-

вань (бронхіти, пневмонії, отити, гайморити, фурункульоз, піодермії, цистити, пієліти, коліти, остеомієліти, гнійно-запальні ускладнення при опіках, пораненнях, хірургічних втручаннях тощо). До переваг автовакцинації слід віднести ефективність при поліетиологічних захворюваннях, позитивну клініко-імунологічну відповідь, відсутність значних поствакцинних реакцій, індивідуальний підхід і можливість застосування в амбулаторних умовах, можливість використання як у вигляді монотерапії, так і в комплексі з традиційними методами лікування. Автовакцина є ефективним засобом боротьби з вогнищем хронічної інфекції, особливо за антибіотикорезистентності збудника, при протипоказаннях до антибіотикотерапії, алергії тощо [15].

Однією з переваг до впровадження автовакцинотерапії в клінічну практику є певні труднощі в отриманні вакцини із свіжовилученого штаму та її очистка, наявність токсичних домішок і зумовлених ними алергізувальних властивостей препарату. Застосування автовакцинації має довгу історію, хоча в широкій практиці так і не набуло значного поширення. Основною причиною цього є складність отримання автовакцини, довготривалість її виготовлення, необхідність дотримання певних лабораторних умов для її отримання і контролю специфічної нешкідливості, нереактогенності, повноти знезараження тощо [15-18].

Для повної загибелі вакцинного штаму були зроблені спроби приготування препарату шляхом використання хлороформу, фенолу, ефіру, карболової кислоти, формаліну, етонію, термічної дії тощо [3].

При виконанні попередньої НДР нами був розроблений та запатентований спосіб отримання вакцин із застосуванням специфічних бактеріофагів і новітнього методу фотодинамічної інактивації бактерій *P. aeruginosa* з використанням як ендогенних сенсibilізаторів рибофлавіну (7,8-диметил-10-рибітілоаллоксазин) та вікасолу (вітамін К₃) з наступним опроміненням світлом фотополімерної лампи та ультрафіолетовими променями [19].

У попередніх дослідженнях експериментальним шляхом (на дослідних тваринах) була підтверджена ефективність застосування розробленого способу та наявність протективних властивостей отриманої фаголізатної синьогнійної вакцини [20-22].

Процес виробництва автовакцини характеризується тією відмінністю, що в кожному випадку використовується новий, вилучений від конкретного хворого штам бактерій, на вивчення характеристик якого (вірулентність, токсигенність, гетерогенність тощо) немає ні часу, ні можливостей, оскільки лікуванню, як правило, підлягають тяжкі хворі. Крім того, для приготування автовакцини використання ефекту фаголізу клітин-бактерій малоперспективне, оскільки комерційні бактеріофа-

ги мають різну вірулентність до циркулюючих штамів збудників, а пошук високолітичних серій чи адаптація фагів є досить довгими, працезатратними і не завжди успішними.

Взагалі ж спосіб знезараження культури повинен бути нескладним, але мати гарантії надійності. Для цього ми надали перевагу комбінації двох сенсibilізаторів і застосуванню послідовного опромінення ультрафіолетом та світлом фотополімерної лампи без додавання суспензії бактеріофагів.

Мета роботи – підвищення протективних властивостей синьогнійної автовакцини, отриманої фотодинамічним способом за удосконаленою технологією.

Матеріали і методи

Ефективність вакцинації оцінювали також за показниками LD₅₀, визначених для дослідної (вакциновані) та контрольної (невакциновані) груп тварин, з розрахунком індексу ефективності (IE): відношення LD₅₀ дослідне до LD₅₀ у контролі.

Для експериментів були задіяні 170 білих безпородних мишей масою 18-20 г, які утримувались у віварії ДУ «ІМІ НАМН» у стандартних умовах і на стандартному харчуванні з вільним доступом до їжі та води за природного освітлення й температури повітря 20-21 °С. Всі експерименти над тваринами відповідали міжнародним правилам (Директива 86/609/ЕЕС) і правилам роботи з тваринами, затвердженим Комітетом з біоетики ДУ «ІМІ НАМН».

Результати досліджень та їх обговорення

Введення мишам вакцини (3 мг/мл за білком) не призводило до загибелі лабораторних тварин протягом 15 діб (період нагляду), а на місці ін'єкції не виявлено ніяких змін. Поведінка вакцинованих мишей практично не змінювалась. Тобто автовакцина нетоксична та неалергенна, що було підтверджено і в попередніх дослідженнях.

При вивченні протективної активності отриманих вакцинних зразків через один тиждень після вакцинації мишей заражали внутрішньочеревинним шляхом гомологічним штамом *P. aeruginosa* в дозі 5×10⁹ мікробних клітин, що відповідало 5LD₅₀.

Таку ж дозу культури вводили неімунізованим мишам – контрольна група. В цій групі вже протягом перших п'яти діб загинуло близько 60 % тварин, а за весь період нагляду (15 діб) цей показник зростав до 80 %.

У результаті розтину загиблих тварин контрольної групи було виявлено цілий ряд патологічних проявів: мікроабсцеси в легенях, печінці, симптоми міокардиту, некрозу очеревини. Культури синьогнійної палички висівали з крові, парних органів та ексудату черевної порожнини аж до кінця періоду нагляду (до 15 діб).

Імунізація мишей розробленою автовакциною дозволила достовірно знизити летальність ($\chi^2 < 0,05$), яка не перевершувала 20 %. При цьому важливо відзначити, що у групах піддослідних тварин, навіть при їх загибелі, вдавалося продовжити їх життя до 10-15 днів.

Результати порівняльного вивчення 3 серій автовакцин (із штаму № 13, № 48 і № 57) показали, що всі

вони давали достовірно позитивний ефект, порівняно з контрольною групою мишей ($\chi^2 > 0,05$, $p < 0,01$, табл. 1).

Показники у групі вакцинованих автовакциною із штаму № 13 та контрольній, при зараженні (через 7 днів після вакцинації) гомологічним штамом (*P. aeruginosa* № 13), були такі: LD50 – відповідно $9,5 \times 10^8$ та $2,8 \times 10^8$ мікробних тіл; ІЕ – 3,4.

Таблиця 1

Протективна дія експериментальних серій автовакцин при контрольному зараженні гомогенними культурами *P. aeruginosa*

Штам для зараження	Група тварин	Всього заражено	Вижили		χ^2	Р відносно контролю
			абс. число	М%±m%		
№ 13	Вакцин.	20	17	85,0±7,98	16,9	<0,01
	Контроль	20	4	20,0±8,94		
№ 47	Вакцин.	10	8	80,0±12,65	23,3	<0,01
	Контроль	10	1	10,0±9,49		
№ 52	Вакцин.	10	8	80,0±12,65	25,0	<0,01
	Контроль	10	2	20,0±12,65		

Висновок

Отримані результати досліджень свідчать про ефективність застосування розробленої технології отримання синьогнійних вакцин та їх протективну активність. Це

вказує на перспективність впровадження автовакцино-терапії у практику охорони здоров'я, що є особливо важливим в період воєнного стану.

Література

- Peng, Y., Bi, J., Shi, J., Li, Y., Ye, X., Chen, X., & Yao, Z. (2014). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections pose growing threat to health care-associated infection control in the hospitals of Southern China: A case-control surveillance study. *American Journal of Infection Control*, 42 (12), 1308–1311.
- Fan, N., Hu, Y., Shen, H., Liu, S. (2020). Profiling of pathogens: Compositional and drug-resistance profiling of pathogens in patients with severe acute pancreatitis: a retrospective study. *BMC Gastroenterol.*, 1, 20 (1), 405.
- Nerobeev, V. D., Nerobeev, D. V. (1988). Vaccination: effectiveness and safety, problems and prospects. *Novosti meditsiny i farmatsii – News of Medicine and Pharmacy*, 10, 34–36 [in Russian].
- Giedrys-Kalemba, S., Czernomysy-Furawicz, D., Fijałkowski, K., & Jursa-Kulesza, J. (2018). Autovaccines in individual therapy of staphylococcal infections. In *Pet-To-Man Travelling Staphylococci* (pp. 253-264). Academic Press.
- Volosach, O. S., Kuzmych, I. A., Zayats, Y. K. (2017). Microbiological efficacy of autovaccination therapy in *Pseudomonas* infection. *elib.grsmu.by*. Retrieved from <http://elib.grsmu.by/bitstream/handle/files/5197/13-16.pdf.pdf?sequence=1> [in Russian].
- Method of preparation of autovaccine (2001). Pat. 39700 Ukraine. No. 2000127520; appl. 26.12.2000; publ. 15.06.2001, 5 [in Ukrainian].
- Galapero, J., Fernández, S., Pérez, C. J., Calle-Alonso, F., Rey, J., & Gómez, L. (2019). Exploring the importance of mixed autogenous vaccines as a potential determinant of lung consolidation in lambs using Bayesian networks. *Preventive Veterinary Medicine*, 169, 104693.
- Daniel, G. V., Laura, S. V., Jose, B. P., Enrique, C. A., Enrique, C. G., Juan, G. G., & Mateo, P. M. (2014). Autovaccines for chronic urinary tract infections; ten years follow-up experience. *American Journal of Life Sciences*, 2(6-3), 13–17.
- Priebe, G. P., & Goldberg, J. B. (2014). Vaccines for *Pseudomonas aeruginosa*: a long and winding road. *Expert review of vaccines*, 13 (4), 507–519.
- Vincent, J. L. (2014). Vaccine development and passive immunization for *Pseudomonas aeruginosa* in critically ill patients: a clinical update. *Future microbiology*, 9 (4), 457–463.
- Volosach, O. S. (2011). Clinical example of successful treatment of autovaccinal mixed infection complicating the course of chronic furunculosis. *Journal of GrSMU*. 1 (33), 12–14 [in Russian].
- Tarasko, A. D., Chelysheva, H. M., Kovalchuk, E. S., Khabibullin, A. M. (2007). Use of autovaccine in the treatment of recurrent and protracted purulent-inflammatory processes in the clinic. *Stationary replacement technologies: Ambulatory surgery*, 4, 221-222 [in Russian].

13. Volosach, O. S. (2017). Immunomodulating role of fungal-bacterial autovaccines, indicators of humoral immunity in patients with chronic inflammatory diseases complicated by candidiasis. *Successes of medical mycology*, 17(17), 227-233 [in Russian].

14. Giedrys-Kalemba, S., Czernomysy-Furowicz, D., Fijałkowski, K., & Jursa-Kulesza, J. (2018). Autovaccines in individual therapy of staphylococcal infections. In *Pet-To-Man Travelling Staphylococci* (pp. 253-264). Academic Press.

15. Jones, A. M., Govan, J. R., Doherty, C. J., Dodd, M. E., Isalska, B. J., Stanbridge, T. N., & Webb, A. K. (2001). Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *The Lancet*, 358(9281), 557-558.

16. Burova, L. M., Burova, E. D. (2016). Antibiotic sensitivity of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektsiyni khvoroby – Infectious diseases*, 3(35), 74-77 [in Ukrainian].

17. Westritschnig, K., Hochreiter, R., Wallner, G., Firbas, C., Schwameis, M., & Jilma, B. (2014). A randomized, placebo-controlled phase I study assessing the safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* hybrid outer membrane protein OprF/I vaccine (IC43) in healthy volunteers. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(1), 170-183.

18. Method for rapid in vitro synthesis of bioconjugate vaccines via recombinant production of n-glycosylated proteins in prokaryotic cell lysates (2018). Appl. 20180016612A1. US. IPC C12P21/005. № US201715650127, filed. 2017.07.14, publ.18.01. 2018 [in Ukrainian].

19. The method of obtaining a vaccine for the prevention and treatment of pseudomonosis (2020). Pat. 143248 Ukraine: IPC C12N1/04(2006.01). № u2012908730; appl. 19.07.2019; publ. 07.27.2020, Bul. 14, 5 [in Russian].

20. Gorodnitskaya, N. I., Gabysheva, L. N., Derkach, S. A., Martynov, A.V. (2018). Immunoprophylaxis of Pseudomonosis: achievements and perspectives. *Annals of Mechnikov's Institute*, 2, 5-15 [in Russian].

21. Derkach, S. A., Horodnytska, N. I., Kutsai, N. M., Gabysheva, L. S. (June 2-4, 2021). The method of production autovaccines from *P. aeruginosa* strains. *The world of science and innovation proceeding of international scientific and practical conference*, 413-420 [in Ukrainian].

22. Akhmatova, N. K., Kalynychenko, E. O., Kurbatova, E. A., Mykhaylova, N. A. (2019). Immunogenicity and protective activity of a recombinant vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Immunology*, 40, 4, 23-28 [in Russian].

PROTECTIVE PROPERTIES OF SYNOGENEOUS AUTOVACCINE SAMPLES

S. A. Derkach, N. M. Kutsai, N. I. Horodnytska, N. I. Skliar

I. Mechnykov Institute of Microbiology and Immunology of NAMS of Ukraine

SUMMARY. The purpose of the work is to increase the protective properties of the blue pyogenes autovaccine obtained by the photodynamic method using improved technology.

Materials and methods. For the experiments, 170 purebred white mice weighing 18–20 g were used. The effectiveness of vaccination was evaluated by the LD_{50} indicators determined for the experimental (vaccinated) and control (non-vaccinated) groups of animals, with the calculation of the efficiency index (IE): the ratio of the experimental LD_{50} to the control LD_{50} .

Research results. It was established that the autovaccine is non-toxic and non-allergenic. When studying the protective activity of the received vaccine samples, one week after vaccination, mice were infected intraperitoneally with a homologous strain of *P. aeruginosa* at a dose of 5×10^9 microbial cells, which corresponded to $5LD_{50}$.

The same dose of culture was administered to non-immunized mice – the control group. In this group, about 60 % of the animals died within the first five days, and during the entire observation period (15 days), this indicator increased to 80 %.

Immunization of mice with the developed autovaccine made it possible to reliably reduce lethality ($\chi^2 < 0.05$), which did not exceed 20 %. In groups of experimental animals, even when they died, it was possible to extend their lives up to 10–15 days.

The results of a comparative study of 3 series of autovaccines showed that all of them had a significantly positive effect compared to the control group of mice ($\chi^2 > 0.05$, $p < 0.01$).

Conclusion. The obtained research results indicate the effectiveness of the application of the developed technology for obtaining anthrax vaccines and their protective activity. This indicates the prospect of introducing autovaccinotherapy into health care practice, which is especially important during martial law.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* infection, autovaccine, photodynamic inactivation of the pathogen, protectiveness of the vaccine.

Відомості про авторів:

Деркач Світлана Андріївна – канд. мед. наук, старший науковий співробітник, завідувачка лабораторії анаеробних інфекцій Державної Установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»; e-mail: svetlanaderkach1111@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1555-2698>

Куцай Наталія Михайлівна – молодший науковий співробітник лабораторії анаеробних інфекцій Державної Установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Меч-

никова Національної академії медичних наук України»;
e-mail: kutsay@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9187-3701>

Городницька Наталія Іллівна – канд. мед. наук, старший науковий співробітник лабораторії анаеробних інфекцій Державної Установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»; e-mail: gorodnickaanatala@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7799-3272>

Скляр Надія Іванівна – канд. мед. наук, старший науковий співробітник, заступник директора з наукової роботи Державної Установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»; e-mail: sklyarimi@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8534-1431>

Information about the authors:

Derkach S. A. – PhD, Head of the Laboratory of Anaerobic Infections of the State Institution «Institute of Microbiology and Immunology of I. I. Mechnikov of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; e-mail: svetlanaderkach1111@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1555-2698>

Kutsay N. M. – junior researcher of the laboratory of anaerobic infections of the State Institution «Institute of Microbiology and Immunology of I. I. Mechnikov of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; e-mail: kutsay@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9187-3701>

Horodnytska N. I. – PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Anaerobic Infections of the State Institution «Institute of Microbiology and Immunology of I. I. Mechnikov of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; e-mail: gorodnickaanatala@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7799-3272>

Skliar N. I. – PhD, SR, Deputy Director for Scientific Work of the State Institution «Institute of Microbiology and Immunology of I. I. Mechnikov of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; e-mail: sklyarimi@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8534-1431>

Конфлікт інтересів: немає.

Authors have no conflict of interest to declare.

Отримано 7.04.2023 р.