

## Состояние и перспективы разработки вакцин для специфической профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции

Э.А. Яговкин<sup>1</sup> (rostovniimp@mail.ru), Г.Г. Онищенко<sup>2</sup>, А.Ю. Попова<sup>3</sup>, Е.Б. Ежлова<sup>3</sup>, А.А. Мельникова<sup>3</sup>, М.Ю. Соловьев<sup>4</sup>, Е.В. Ковалев<sup>4</sup>, Т.И. Твердохлебова<sup>1</sup>, Г.В. Хмелевская<sup>1</sup>, Л.В. Девтерова<sup>1</sup>, Б.Ф. Вачаев<sup>1</sup>, И.Л. Юрьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону

<sup>2</sup>Российская академия наук, Москва

<sup>3</sup>Роспотребнадзор, Москва

<sup>4</sup>Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, г. Ростов-на-Дону

### Резюме

В обзоре обобщены материалы исследований по разработке вакцин против (неполио) энтеровирусной инфекции в России и за рубежом. Описаны разрабатываемые виды вакцин, их характеристики и результаты клинико-эпидемиологических испытаний, созданных в Китае инактивированных вакцин. Рассматриваются возможность создания мукозальных вакцин и стратегия вакцинопрофилактики.

**Ключевые слова:** (неполио) энтеровирусная инфекция, вакцина, вакцинопрофилактика

### Condition and Prospects of Development of Vaccines for Specific Prevention of Enterovirus (Nonpolio) Infection

E.A. Yagovkin<sup>1</sup> (rostovniimp@mail.ru), G.G. Onishchenko<sup>2</sup>, A.Yu. Popova<sup>3</sup>, E.B. Ezhlova<sup>3</sup>, A.A. Melnikova<sup>3</sup>, M.Yu. Soloviev<sup>4</sup>, E.V. Kovalev<sup>4</sup>, T.I. Tverdokhlebova<sup>1</sup>, G.V. Khmelevskaya<sup>1</sup>, L.V. Devterova<sup>1</sup>, B.F. Vachaev<sup>1</sup>, I.L. Yuryeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Budgetary Institution of a science «Rostov Research Institute microbiology and parazitology» of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Rostov-on-Don

<sup>2</sup>The Russian Academy of sciences, Moscow

<sup>3</sup>Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Russia, Moscow

<sup>4</sup>Territorial Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Rostov's Region, Rostov-on-Don

### Abstract

This review summarizes the material on the development of vaccines against (nonpolio) enterovirus infection in Russia and abroad. Described the developed vaccine types, their characteristics and the results of clinical and epidemiological trials, created in China inactivated vaccines. It is considered the possibility of creating a mucosal vaccines and vaccinal prevention strategies.

**Key words:** (nonpolio) enterovirus infection, vaccine, vaccinal prevention

### Введение

В настоящее время вакцинопрофилактику рассматривают как наиболее доступный и экономически выгодный способ защиты и укрепления здоровья населения [1]. Она является важнейшей составляющей профилактической направленности современной медицины. Успешность борьбы с полиомиелитом – одной из тяжелейших энтеровирусных инфекций – яркий тому пример.

Выдвинутый ВОЗ «Стратегический план ликвидации полиомиелита и осуществления завершающего этапа в 2013 – 2018 годах» предполагает поэтапную замену живой полиомиелитной вакцины на инактивированную. При этом некоторые эксперты считают, что внедрение в широкую медицинскую практику оральной полиомиелитной вакцины дало возможность не только в короткие сроки прекратить эпидемии полиомиелита, но и одновременно

оказать неспецифическое, но существенное влияние на распространение возбудителей серозного менингита, вызываемого (неполио) энтеровирусом (ЭВ), что привело к сокращению числа эпидемий и заболеваний, вызываемых неполиомиелитными энтеровирусами.

Эффект сокращения заболеваемости (неполио) энтеровирусными инфекциями за счет применения ОПВ связывается с тем, что вакцинные штаммы вируса полиомиелита подавляют в организме другие энтеровирусы через неспецифические реакции интерференции с (неполио) энтеровирусами, приводящие к уменьшению приживаемости патогенных (неполио) энтеровирусов и таким образом – к снижению уровня их циркуляции. Вакцинация детей ОПВ, использованной в качестве неспецифического интерферирующего агента, неоднократно успешно применялась и позволяла прервать вспышки

и эпидемии, вызываемые (неполио) энтеровирусами, в том числе энтеровирусом 71 типа [2 – 5].

Переход на вакцинацию исключительно инактивированной полиомиелитной вакциной, по видимому, может привести к возрастанию значимости неполиомиелитных энтеровирусов в патологии человека за счет исключения интерферирующего действия живых вакцин. В последние годы в мире, особенно в странах Юго-Восточной Азии и Тихоокеанском регионе наблюдается подъем заболеваемости энтеровирусными инфекциями, особенно вызванными ЭВ 71 типа. Выраженные миграционные процессы, отмеченные в последнее время, способствуют интенсивному обмену и заносу возбудителей в другие регионы мира [6]. Так, в 2013 году в южных регионах Российской Федерации резко обострилась эпидемическая ситуация по энтеровирусной инфекции, вызванной ЭВ 71 типа. Учитывая это, проблема создания вакцинных препаратов для специфической профилактики заболеваний, вызываемых неполиомиелитными вирусами, приобретает актуальную значимость для стран не только Тихоокеанского региона, но и Европы, в том числе России.

В Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова впервые в мировой практике проводились исследования по получению и применению энтеровирусных вакцин с использованием аттенуированных штаммов (неполио) энтеровирусов, которые обладали профилактическим действием и купировали заболеваемость (неполио) энтеровирусной инфекцией у детей [7]. В связи с тем что в последние годы в мире, особенно в странах Юго-Восточной Азии и Тихоокеанского региона, наблюдался серьезный подъем заболеваемости энтеровирусными инфекциями, особенно вызываемые ЭВ 71 типа, начались интенсивные исследования по поиску методов специфической профилактики заболеваний энтеровирусными инфекциями и разработке вакцин против наиболее эпидемически значимых серотипов (неполио) энтеровирусов. В частности, в обзоре D. Zhang, Y. Lu, Y. Lu [8] на основе анализа 55 статей, датированных с 1974 по 2009 год, представлены и охарактеризованы различные подходы к созданию вакцины против ЭВ 71 типа, на которых мы остановимся ниже.

#### **Инактивированные вакцины**

Известно, что инактивированные вирусные вакцины при многих инфекциях (грипп, гепатит А, полиомиелит) успешно и эффективно применяются в практическом здравоохранении. С.К. Yu et al. [9] показали, что полученные от мышей, иммунизированных инактивированным (формалином или термической обработкой) штаммом ЭВ 71, сыворотки содержали IgM и IgG. Эти результаты свидетельствуют о возможности использования инактивированной вирусной вакцины для эффективного контроля за ЭВ 71 типа. При этом была отмечена важность сохранения трехмерной структуры инак-

тивированных вирусных вакцин. Предпочтение было отдано использованию для инактивации вакцин формалина, при термической инактивации необходимы увеличение иммунизирующей дозы и введение адъюванта.

При создании инактивированных вакцин важное значение имеет подбор штаммов вируса. Y.C. Lin et al. [10] использовали штамм ЭВ 71 (YN3-4a), обладающий высоким темпом роста в культуре клеток Vero, образующий большие бляшки и вирулентный для новорожденных мышей. Антисыворотка против этого штамма нейтрализовала широкий спектр штаммов ЭВ 71, выделенных от пациентов из различных географических мест в разное время.

При подборе штамма для инактивированных вакцин важно учитывать такие характеристики, как высокий вирусный выход, способность размножаться в средах без сывороток, сильный потенциал иммуногенности и стабильность свойств. S.C. Wu et al. [11], C.C. Liu et al. [12] показали, что при культивировании вирусов на клетках Vero в бессывороточных средах уменьшается выход вируса, но повышается вируснейтрализующая активность сывороток, полученных при иммунизации инактивированным вирусом.

#### **Вакцины на основе аттенуированных штаммов**

Примером успешного применения аттенуированных вакцин против энтеровирусов является оральная живая аттенуированная полиомиелитная вакцина из штаммов А. Сэбина.

Учитывая сходство между полиовирусом и ЭВ 71 типа, M. Arita et al. [13, 14] получили аттенуированный штамм ЭВ 71 (S1-3') с мутациями в нетранслируемых областях 5' UTR 3D полимеразы (3D pol) и 3' UTR 5', ответственных за аттенуацию вируса. Штамм ЭВ 71 (S1-3') характеризовался ослабленной нейровирулентностью и сниженной способностью к репродукции. Обезьяны, привитые аттенуированным штаммом ЭВ71 (S1-3'), а затем зараженные летальной дозой вирулентного штамма ЭВ71 (BrCr-TR), выживали, но имели небольшое неврологическое отклонение (тремор) [15]. Инфицирование обезьян оральным путем не вызывало неврологических нарушений у привитых животных. Сыворотка, полученная от иммунизированных обезьян, обладала широким нейтрализующим действием против различных генотипов штамма ЭВ 71.

При создании аттенуированных живых (неполио) энтеровирусных вакцин необходимо иметь в виду возможность возникновения тех же проблем, что имеют место при применении живой оральной полиомиелитной вакцины, такие как реверсии к вирулентности и получение вакцинородственных штаммов.

Таким образом, главной проблемой при создании аттенуированной (неполио) энтеровирусной вакцины является ее генетическая стабильность.

## Субъединичные вакцины

Для решения проблемы преодоления реверсии вирулентности аттенуированных вакцинных штаммов энтеровируса с использованием рекомбинационных технологий разработаны субъединичные вакцины, состоящие из одной или нескольких субъединиц белков, которые могут индуцировать иммунитет против вирусов. Белки VP1, VP2, VP3 энтеровируса 71 типа являются общими для всех энтеровирусов и отвечают за антигенное разнообразие энтеровирусов. Большой капсидный белок VP1 ЭВ 71 имеет эпитопы, обеспечивающие нейтрализующую активность энтеровируса. С.N. Wu et al. [16] описали свойства рекомбинантного белка VP1, полученного путем экспрессии гена энтеровируса в *E. coli* BL21. Полученный рекомбинантный белок VP1 с адьювантом в опытах по иммунизации мышей приводил к образованию нейтрализующих вирус антител, стимулировал Т-хелперный иммунный ответ и повышал уровень интерлейкина 2 и интерферона гамма, что является доказательством его иммуногенности и возможности использования для создания субъединичной вакцины против ЭВ 71.

В исследованиях L. Xu et al. [17] показано, что в петле EF капсидного белка VP2 ЭВ-71 имеется эпитоп, обеспечивающий при иммунизации образование перекрестно-нейтрализующих антител. Это подчеркивает важность включения в субъединичные вакцины не только VP1, но и других белков в том числе VP2.

Выполнен ряд экспериментальных исследований [18, 19, 20] по получению и применению трансгенных продуктов, в которые встроен ген белка VP1 энтеровируса, обеспечивающий продукцию белка VP1. У экспериментальных животных, иммунизированных перорально трансгенными продуктами, имело место образование специфических IgA и сывороточных IgG против VP1 антигена энтеровируса 71 типа.

К настоящему времени исследования по субъединичным вакцинам не вышли за рамки экспериментальных работ.

## ДНК-вакцины

Технология на основе использования ДНК заключается в том, что накопление протективного антигена происходит в организме прививаемого. При этом ДНК конструкция, которая кодирует синтез протективного антигена, встраивается в вектор, в качестве которого выступают плазмиды, фаги, вирусы, липосомы, эукариотические клетки. Вектор со встроенной ДНК вводится в организм вакцинируемого, в котором происходит наработка протективного антигена. Вакцины, создаваемые с помощью рассматриваемой технологии, называются ДНК-вакцинами [21].

W.S. Tung et al. [22] разработали ДНК-вакцину против ЭВ 71 типа путем включения гена, отвечающего за синтез белка VP1 вируса в эукари-

отический вектор. В ответ на введение мышам ДНК-вакцины уровень IgG против VP1 антигена у них повышался, при бустерной иммунизации – понижался. IgG обладал вируснейтрализующим эффектом, но более низким по сравнению с антителами, выявляемыми у человека, перенесшего энтеровирусную инфекцию.

Другая ДНК-вакцина, разработанная С.N. Wu et al. [23], стабильно вызывала образование вируснейтрализующих антител в высоких титрах, которые длительно сохранялись после иммунизации.

Необходимо отметить, что ДНК-вакцины вызывают более слабый иммунный ответ по сравнению с цельновирионными. Для повышения иммуногенности ДНК-вакцин применяют: включение иммуностимулирующих нуклеотидных последовательностей в ДНК конструкцию; адьюванты; усовершенствованные методы доставки, в частности с использованием липосом.

Разработка ДНК-вакцин против ЭВ 71 типа пока носят экспериментальный характер. По мнению ряда исследователей [20], внедрение ДНК-вакцин в практику зависят от сроков ответа на два вопроса:

1. Безопасно ли в генетическом плане включение ДНК микроорганизма в геном позвоночного?
2. Как будет влиять непрерывный синтез протективного антигена на иммунологический гомеостаз привитого и как его иммунная система будет реагировать на собственные клетки, экспрессирующие чужой антиген?

## Эпитопные пептидные вакцины

Современное развитие иммунохимии и молекулярной биологии позволили подойти к созданию нового класса так называемых эпитопных вакцин. Технология основана на разделении и выделении из крупной молекулы антигена ее небольшой части, которая ответственна за специфическую активность и способность связывания с рецепторами антигенпрезентирующих клеток иммунной системы (макрофаги, дендритные клетки, содержащие толл-подобные рецепторы, Т- и В-лимфоциты) и вызывает стимуляцию иммунных реакций макроорганизма. Эта небольшая часть молекулы антигена, являющаяся его антигенной детерминантой, и есть эпитоп. Если антиген имеет белковую природу, то эпитоп будет представлен пептидом, если полисахаридную – эпитоп будет состоять из олигосахаридных единиц. Специфические эпитопы могут быть искусственно синтезированы. Из них могут быть приготовлены различные конструкции, увеличивающие их иммуногенность, путем комбинации эпитопных единиц, введения адьювантов. Используя методы генетической инженерии, возможно выделить из гена специфические для эпитопа нуклеотидные последовательности, трансформировать их в молекулярные векторы и получить генно-инженерные продукты для создания вакцин.

Известно, что эффективность иммунного отве-

та на вирусную инфекцию зависит от клеточного ответа Т-хелперов (CD4), цитотоксических клеток (CD8), Т-киллеров. В связи с этим важное значение имеет определение структуры эпитопов антигена, ответственных за проявление клеточного иммунитета. В отношении ЭВ 71 типа опубликованы результаты исследований [23 – 26], направленные на идентификацию эпитопов пептида VP1 ЭВ 71 типа, которые оказывали пролиферативное действие на Т- и В-клетки. Были идентифицированы 3 эпитопа VP1 в положении аминокислот (66 – 77); (145 – 154); (247 – 261). Эти 3 эпитопа вызывали пролиферацию Т-хелперных CD4-клеток с последующей стимуляцией продукции IL2 и IFN-g, при этом эпитоп (145 – 154) – в большей степени. В дальнейшем для идентификации пептидов, участвующих в реакции нейтрализации, были синтезированы 95 эпитопных пептидов, охватывающих капсид белка VP1 ЭВ 71 типа. Пептиды, содержащие аминокислоты в положениях (163 – 177) и (208 – 222) белка VP1 были способны вызывать образование вируснейтрализующих антител.

В исследованиях Y.-X. Li et al. [27] показана новая стратегия создания рекомбинантной вакцины против ЭВ 71 типа, основанная на получении tandemно расположенных множественных линейных комбинированных эпитопов капсидных белков VP1 – SP55, VP1 – SP70 и VP2 – SP28, так называемого белка TLNE (мультилинейный, tandemный нейтрализующий эпитоп). Этот рекомбинантный, очищенный аффинной хроматографией белок вызывал образование вируснейтрализующих IgG и стимулировал развитие гуморального иммунитета, защищая новорожденных мышей при их заражении летальной дозой энтеровируса 71 типа.

Разработка технологий получения эпитопных пептидных вакцин перспективна в отношении не только энтеровирусов (неполио), но и других возбудителей вирусных инфекций. Так, в ГНУВБ «Вектор» [28] были созданы искусственные полиэпитопные иммуногены из различных белков и субтипов ВИЧ. Полученные вакцинные конструкции индуцировали формирование ВИЧ-специфического гуморального и клеточного ответа, что явилось основанием для проведения их клинических испытаний в качестве кандидатных вакцин против ВИЧ.

### **Вакцины на основе вирусоподобных частиц (virus like particle vaccine – VLPV)**

Вирусоподобные частицы VLPS – это пустые частицы вирусов, состоящие из основных структурных белков, имитирующие организацию и конформацию нативных вирусов. На сегодняшний день сконструировано ряд VLP-вакцин (например, против ВИЧ, коронавируса), которые вызывают образование вируснейтрализующих антител и стимулируют Т-клеточный цитотоксический ответ. Создание VLPS-вакцин против (неполио) энтеровирусов является перспективным направлением,

так как сохраняется конформационная структура эпитопов, что имеет значение для иммуногенности вакцин, кроме того, отсутствует риск получения вирулентных ревертантов, что имеет место при применении живых аттенуированных вакцин. Учитывая это, Y.C. Hu et al. [29] и Y.C. Chung et al. [30] использовали рекомбинантную систему бакуловирусов насекомых для получения VLPS-частицы ЭВ 71 типа, которые в эксперименте на животных вызывали Th-1 и Th-2 хелперный ответ. При этом было показано, что потомство, полученное от иммунизированных VLPS-вакциной, было защищено от заражения ЭВ 71 типа.

В настоящее время VLPS-вакцины в основном разрабатываются с использованием клеток насекомых, что ограничивает масштабность выпуска вакцин. Для данной технологии могут быть полезны трансгенные растения и дрожжи, способные продуцировать VLPS-частицы, что создает возможность их использования для оральной вакцинации или путем инъекции.

В последующих исследованиях разрабатывались рекомбинантные технологии по получению и изучению вирусоподобных частиц энтеровируса 71 типа [31] и комбинации ЭВ 71 и вируса Коксаки А 16 (бивалентные вакцины) [32]. Эти препараты активировали Th1- и Th2-клеточные иммунные ответы и были эффективны при испытаниях в тесте пассивной защиты мышей.

В исследовании Yu-L. Lin et al. [33] было показано, что вирусоподобные частицы ЭВ 71 типа активировали толл-подобные рецепторы человеческих дендритных моноцитарных клеток, что имеет важное значение для функционирования системы клеточного иммунитета и подчеркивает возможность данной технологии для получения эффективных вакцин.

Таким образом, неблагоприятная эпидемиологическая ситуация в странах Азиатско-Тихоокеанского региона по энтеровирусной (неполио) инфекции 71 типа стала серьезной угрозой здравоохранению, что активизировало работу по созданию вакцины против этой инфекции, и прежде всего против ЭВ 71 типа. Учитывая сходство вируса полиомиелита и ЭВ 71 типа, а также высокую эффективность созданных против полиомиелита вакцин (ОПВ и ИПВ), данные технологии были применены и для создания экспериментальных вакцин против ЭВ 71 типа. Были также разработаны вакцинные препараты с использованием различных молекулярно-биологических методов, однако эти методы, несмотря на перспективность, к настоящему времени не вышли за рамки экспериментальных исследований.

Учитывая побочные эффекты аттенуированных вакцин, основное внимание уделено созданию формалин-инактивированных вакцин, сохраняющих конформационные свойства основных пептидных эпитопов вирусов, играющих важную роль в индукции иммунного ответа. Были проведены на доклиническом этапе углубленные исследования пяти



инактивированных формалином цельновирионных вакцин [34 – 39]. В опытах на экспериментальных животных все вакцины обладали вируснейтрализующей активностью, защищали животных и были безопасны. Из числа этих вакцин три вакцины вышли на второй и третий этапы рандомизированных плацебо-контролируемых двойных испытаний.

Краткое описание 3-й фазы испытаний и трех вакцин, полученных разными производителями Китая [38], представлены в таблице 1.

В настоящее время при конструировании вакцинных препаратов, в том числе для профилактики (неполио) энтеровирусных инфекций, необходимо учитывать особенности функционирования систем врожденного и адаптивного иммунитета, как при нормальном физиологическом состоянии, так и в

процессе инфицирования энтеровирусами. К сожалению, публикации по данному вопросу немногочисленны. Известно, что иммунный ответ при инфекционном заболевании и при иммунизации является многостадийным процессом. После взаимодействия антигенов возбудителя или вакцин с антигенпрезентирующими клетками (макрофаги, дендритные клетки, лимфоциты) происходит поляризация Т-хелперов (Th) с формированием двух субпопуляций цитокин-образующих клеток Th1 и Th2. Субпопуляция клеток Th1 вырабатывает INF $\gamma$ , IL2, IL3, ФНО и формирует клеточный иммунитет путем активации цитотоксических CD8+ лимфоцитов, направленных на освобождение организма от зараженных вирусом клеток. Субпопуляция клеток Th2 вырабатывает IL4, 5, 6, 9, 10 – 13 и контролирует развитие гумораль-

**Таблица 1.**  
**Характеристика кандидатных вакцин против ЭВ 71 типа из континентального Китая (Li L. et al. [38])**

Характеристика показателей	Наименование вакцин		
	Blijing Vigoo	Sinovac	CAMS
Производственные процессы:			
1. Используемые клеточные линии клеток	Vero-клетки	Vero-клетки	Диплоидные линии клеток KMB-17
2. Используемые штаммы вирусов	ЭВ 71 типа, субгенотип С4	ЭВ 71 типа, субгенотип С4	ЭВ 71 типа, субгенотип С4
3. Характеристики выращивания и инактивации	С использованием ферментеров Инактивация в среде, содержащей сыворотку	Инактивация в среде, содержащей сыворотку	Во флаконах с использованием роулеров Инактивация в среде с содержанием сыворотки
Характеристика 3-й фазы испытаний	Мультицентровое рандомизированное, двойное плацебо-контролируемое с целью оценки эффективности вакцины против заболеваний, вызываемых ЭВ71 типа.	Мультицентровое рандомизированное, двойное плацебо-контролируемое с целью оценки эффективности вакцины против заболеваний, вызываемых ЭВ71 типа.	Мультицентровое рандомизированное, двойное плацебо-контролируемое с целью оценки эффективности вакцины против заболеваний, вызываемых ЭВ71 типа.
Продолжительность периода испытаний исследований	С января 2012 по март 2013 года	С января 2012 по март 2013 года	С января 2012 по февраль 2013 года
Возрастные группы	Дети в возрасте от 6 до 35 месяцев	Дети в возрасте от 6 до 35 месяцев	Дети в возрасте от 6 до 71 месяцев
Количественные характеристики групп	Всего 10245 5120 – привитых вакциной 5125 – группа с плацебо	Всего 10077 5044 – привитых вакциной 5033 – группа с плацебо	Всего 12000 6000 – привитых вакциной 6000 – группа с плацебо
Примененные дозы вакцин	320 ед. в 0,5 мл (0,5 мкг ЭВ 71 типа)	400 ед. в 0,5 мл (1,0 мкг ЭВ 71 типа)	100 ед. в 0,5 мл.
Схема вакцинации	Двукратно с интервалом 28 дней	Двукратно с интервалом 28 дней	Двукратно с интервалом 28 дней
Другие контролируемые свойства	1. Безопасность 2. Иммуногенность 3. Продолжительность антительного ответа 4. Учет серологического дрейфа 5. Эффективность вакцинации 90,9% (70,0 – 97,2%)	1. Безопасность 2. Иммуногенность 3. Продолжительность антительного ответа 4. Учет серологического дрейфа 5. Эффективность вакцинации 94,8% (87,2 – 97,9%)	1. Безопасность 2. Иммуногенность 3. Продолжительность антительного ответа 4. Учет серологического дрейфа 5. Эффективность вакцинации 97,4% (92,9 – 99,0%)

ного иммунного ответа, обеспечивая активацию В-клеточной системы и синтез IgM с последующим переключением на IgG [40].

В исследовании Н.А. Бацкалевич [41] были изучены иммунологические особенности показателей врожденного и адаптивного иммунитета у подростков с энтеровирусным менингитом. Результаты изучения свидетельствовали о супрессии клеток-эффекторов, участвующих в формировании врожденного и приобретенного клеточного иммунитета. Особенностью иммунологической перестройки при энтеровирусном менингите стало снижение показателей клеточного звена иммунитета: CD3-, CD8-, CD 16-. Падение численности цитотоксических лимфоцитов CD8, а также CD16 способствовало генерализации процесса, нарушению гематоэнцефалического барьера и могло приводить к развитию менингита. При сниженных показателях CD8-лимфоцитов и NK-клеток наблюдалась поздняя санация ликвора. Формирование специфического гуморального и клеточного иммунитета приводило, как правило, к выздоровлению.

В защите от энтеровирусной инфекции значение имеет как клеточный, так и гуморальный иммунитет. Ведущим механизмом освобождения от заражения вирусом клеток является функционирование лимфоцитов Th1 и действие цитотоксических лимфоцитов [42, 43]. Следовательно при создании вакцинных препаратов важно исследовать влияние кандидатных вакцин на механизмы развития иммунитета. Предпочтение должно быть отдано препаратам, создающим клеточный иммунитет по Th1-типу и стимулирующим образование вируснейтрализующих антител G-класса. Для направления систем иммунитета по Th1-типу применяют адъюванты, липосомы, депоненты, иммуномодуляторы и пр. Полученные в Китае инактивированные вакцины против ЭВ 71 типа депонировались на геле гидроксида алюминия. Одним из перспективных направлений по созданию вакцин, активизирующих механизмы клеточного иммунитета, являются конъюгированные вакцины. Конъюгационные технологии основаны на ковалентном связывании В-зависимых антигенов (полисахариды, низкомолекулярные пептиды) с Т-зависимым белком (столбнячный, дифтерийный анатоксины), что обеспечивает развитие иммунитета к В-зависимым антигенам по Т-клеточному типу. Имеется большой международный опыт получения конъюгированных полисахаридных вакцин против гемофильной, стрептококковой, менингококковой инфекций, которые обеспечили многократное снижение заболеваемости и смертности детей от этих инфекций [44]. У нас в стране в Ростовском НИИ микробиологии и паразитологии разработана первая отечественная конъюгированная вакцина против гемофильной инфекции тип b [45 – 47] и начат ее промышленный выпуск.

Механизмы активации иммунного ответа конъюгированными вакцинами еще полностью не раскрыты и, по мнению экспертов, дальнейшие исследования позволят создать высокоэффективные вакцины нового поколения [48].

Особый интерес, на наш взгляд, представляет использование конъюгационных технологий при получении эпитопных поливалентных и комбинированных (неполио) энтеровирусных вакцин.

Входными воротами (неполио) энтеровирусом являются слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей. Местная защита слизистых препятствует проникновению возбудителей в кровь. От степени колонизационной резистентности этого важного слизистого барьера будет зависеть исход заболевания. Этим определяется необходимость создания мукозальных вакцин и мукозальной вакцинации. Блестящим примером мукозальных вакцин и мукозальной иммунизации является живая оральная аттенуированная полиомиелитная вакцина из штаммов Сэбина. Мукозальная иммунизация является оправданной и обоснованной, так как через слизистые барьеры проходит основная масса возбудителей и в слизистых оболочках имеются клетки, ответственные за реакции иммунитета. Преимуществами мукозальной вакцинации являются неинвазивность метода, экономическая эффективность, возможность в короткие сроки привить большой контингент.

Эффективность мукозальных вакцин во многом зависит от степени фиксации антигенов вакцин на клетках слизистой оболочки (оптимально в зонах М-клеток). Живые аттенуированные вакцины обладают лучшей способностью к фиксации в сравнении с инактивированными. По этой причине инактивированные вакцины создают непродолжительный иммунитет и требуется многократная вакцинация. Поэтому при разработке мукозальных вакцин используют различные подходы с применением адъювантов, новых систем доставки антигенов, введение препаратов, направляющих работу иммунной системы по Th1-типу и другие методы, описанные в обзорах и статьях [21, 49, 50].

В плане разработки экспериментальных мукозальных вакцин против энтеровируса 71 типа с использованием рекомбинантных белков и вирусных частиц представляет интерес исследование Zhang Fu et al. [51], в котором установлено, что при оральной иммунизации мышей препаратами, содержащими белок VP1 и очищенные вирусные частицы, введенными совместно с биополимером хитозаном, активируются цитокиновые системы, стимулирующие Th1- и Th2-типы иммунных ответов. При этом увеличивалось содержание IgA, играющего важную роль в местной защите, а также вируснейтрализующих антител в сыворотке. Это свидетельствует о перспективности развития исследований в данном направлении.

Разработка вакцин против энтеровирусных (неполио) инфекций должна учитывать циркулирующие штаммы энтеровирусом и базироваться на данных мониторинговых эпидемиологических исследований. Несомненно, разрабатываемые энтеровирусные (неполио) вакцины должны применяться исключительно по эпидемическим показаниям. ■

## Литература

1. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А. Актуальные вопросы организации вакцинопрофилактики в Российской Федерации. *Микробиол.* 2011; 5: 110 – 114.
2. [http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/StrategyWork/PEESP\\_ES\\_RUS\\_A4.pdf](http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/StrategyWork/PEESP_ES_RUS_A4.pdf)
3. Сейбиль В.В., Малышкина Л.П. Энтеновирусы в XX – XXI веках. *Микробиол.* 2005; 4: 83 – 89.
4. Яшуков К.Б., Шевырева М.Н., Лазикова Г.Ф., Ясинский А.А., Котова Г.А., Чимидова Р.И. Вспышка энтеровирусной инфекции с серозным менингитом в Республике Калмыкия и меры по ее локализации и ликвидации. *Здоровье населения и среда обитания.* 2003; 5 (122): 12 – 18.
5. Shindarov J., Chumakov M.P., Voroshilova M.K. et al. Epidemiological, clinical and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis like disease caused by enterovirus 71. *J. Hug. Epidemiol. Microbio.* 1979; 23: 284 – 295.
6. В.И. Покровский. *Инфекционные болезни и эпидемиология;* 2007.
7. Ворошилова М.К. Энтеновирусные инфекции человека. Москва; 1970: 295 – 340.
8. Zhang D., Lu Yi., Lu Yi. Enterovirus 71 vaccine: close but still far. *International Journal of Infection Diseases.* 2010; 14: 749 – 743.
9. Yu C.K., Chen C.C., Chen C.L., Wang J.R., Liu C.C., Yan J.J. et al. Neutralizing antibody provide protection against enterovirus type 71 lethal challenge in neonatal mice. *J. Biomed Sei.* 2000;7: 523 – 528.
10. Lin Y.C., Wu C.N., Shin S.R., Ho M.S. Characterization of a vero-cell adapter virulent strain of enterovirus 71 suitable for use a vaccine candidate. *Vaccine.* 2002; 20: 2485 – 2495.
11. Wu S.C., Liu C.C., Lian W.C. Optimization of micro carrier cell process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. *Vaccine.* 2004; 22: 3858 – 3964.
12. Liu C.C., Lian W.C., Butler M., Wu S.C. High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free micro carrier vero-cell culture. *Vaccine.* 2007; 25: 19 – 24.
13. Arita M., Ami Y., Wakita T., Shimizu H., Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus Sabine 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. *J. Virol.* 2007: 9386 – 9395.
14. Arita M., Shimizu H., Nagata N., Ami Y., Suzaki Y., Sata et al. Temperature sensitive mutants of enterovirus monkeys. *J. Gen. Virol.* 2005; 86: 391 – 1401.
15. Arita M., Nagata N., Iwata N., Ami Y., Suzaki Y., Mizuta K. et al. An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype A showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkey. *J. Virol.* 2007; 81: 9386 – 9395.
16. Wu C.N., Lin Y.C., Fanu C., Liao N.S., Shih S.R., Ho M.S. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccine and inactivated virus. *Vaccine.* 2001; 20: 3858 – 3864.
17. Xu L., He D., Li Zh., Zheng J., Yang L., Yu M. et al. Protection against lethal enterovirus 71 challenger in mice by recombinant vaccine Candidate containing a Broadly Cross-neutralizing epitope with the VP EF Loop. *Theranostics.* 2014; 4 (5): 498 – 502.
18. Neglected Tropical Disease/ DOI:10.1371/Journal.pntd.0003692 April 9.2015: 1/22-21/22.
19. Chen H.F., Chang M.H., Chiang B.L., Jeng S.T. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. *Vaccine.* 2006; 24: 2944 – 2951.
20. Chen H.L., Huang J.J., Chu T.W., Tsai T.C., Huang C.M., Lin C.C. et al. Expression of VP1 protein in the milk of transgenic mice a potential oral vaccine protects against enterovirus 71 infection. *Vaccine.* 2008; 26: 2882 – 2889.
21. Семенов Б.Ф., Зверев В.В., Хаитов Р.М., *Вакцинопрофилактика в XXI веке: настоящее и будущее.* Иммунология. 2009; 30 (6): 324 – 335.
22. Tung W.S., Bakaz S.A., Sekawi Z., Rosli R. DMA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immune response in mice. *Genet. Vaccines Ther.* 2007; 5: 7.
23. Wu C.N., Lin Y.C., Fanu C., Liao N.S., Shih S.R., Ho M.S. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccine and inactivated virus. *Vaccine.* 2001; 20: 3858 – 3864.
24. Foo D.G., Macary P.A., Alonso S., Poh C.P. Identification of human CD4 T-cell epitopes on the VP1 capsid protein of enterovirus 71. *Virol immunol.* 2008; 21: 213 – 224.
25. Foo D.G., Alonso S., Phoon M.C., Ramachandran N.P., Chow V.T., Pon C.L. Identification of neutralizing liner epitopes from VP capsid protein of enterovirus 71 using syntetic peptides. *Virus Res.* 2007; 125: 61 – 68.
26. Foo D.G., Alonso S., Chow V.T., Poh C.L. Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing elicited by syntetic peptide. *Microbes Infect.* 2007; 9: 1299 – 1306.
27. Li Y.-X., Zhao H., Cao R.-Y., Deng Y.-Q., Han J.-F., Zhu Sh.-Ya. et al. Recombinant tandem multi-linear neutralizing epitopes of human enterovirus 71 elicited protective immunity in mice. *Virology Journal.* 2014; 11 (79): 2 – 8. Доступно на: <http://www.virology.com/content//11/1/79>.
28. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Ужаченко Р.В., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Агафонов А.В. и др. Различные формы кандидатных вакцин против ВИЧ-1, несущих полиэпитопные иммуногены. *Биопрепараты.* 2006; 4: 8 – 10.
29. Hu Y.C., Hsu J.T., Huang J.H., Ho M.S., Ho Y.C. Formation of enterovirus-like particle aggregates by recombinant baculoviruses co-expressing P1 and 3CD in insect cells. *Biotechnol Lett.* 2003; 25: 919 – 925.
30. Chung Y.C., Ho M.S., Wu J.C., Chen W.J., Huang J.H., Chou S.T. et al. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protect mice against lethal challenge. *Vaccine.* 2008; 26: 1855 – 1862.
31. Tsou Y.-L., Lin Yi.-W., Shao H.-Yu., Yu Sh.-L., Wu Sh.-R., Lin H.-Yu. et al. Recombinant Adeno-vaccine expression enterovirus 71-like particles against Hand, Foot and Mouse Disease. *PLOS Neglected Tropical Disease/ DOI:10.1371/Journal.pntd.0003692 April 9.2015: 1/22-21/22*
32. Zhao H., Li H.-Ya., Han Ji.-F., Deng Yo.-Q., Zhu Sh.-Ya., Li X.-F. et al. Novel recombinant chimeric virus-like particle is immunogenic and protective against bothe enterovirus 71 coxsackievirus A16 in mice. *Scientific Reports [5:7878] DOI:10.1038/s 07878 Pub 19 January 2015: 1 – 7.*
33. Lin Yu.-L., Hu Yu.-Ch., Lian Ch.-Ch., Lin Sh.-Ye., Liang Yu.-Ch., Yuan H.P. et al. Enterovirus-like particles induce the activation and maturation of human monocyte-derived dendric cells through TLR4 signaling. *Plos one/www.plosone.org/October 2014/volume 9/issue 10/e111u96: 1 – 11.*
34. Chai O.K., Shamala D., Jam C.M., Thong W.K. Formaldehyde-inactivated whole –virus vaccine Protects a Murine Model of enterovirus 71 Encephalomyelitis against Disease. *Journal of virology.* 2010; January: 661 – 665.
35. Chou Ai.-H., Liu Ch.-Ch., Chang Gh.-Peng., Guo M.-Sh., Hsieh Sh.-Yu., Yung W.-H. et al. Pilot scale production of Highly efficacious and stable enterovirus 71 vaccine candidates. *Plos one www.plosone.org 2012; v7. April: 1 – 9.*
36. Hwu Shi.-H., Lu Y.A., Brewoo J., Partidos C.D., Osorio J.E., Santangelo J.D. Preclinic evolution of the Immunogenicity and Safety of an Inactivated Enterovirus 71 candidate vaccine. *Plos Neglected Tropical Diseases www.plosntds.org 2013; 7: 1 – 7.*
37. Liu Ch.-Ch., Hwang Ch.-S., Yang W.-S., Tsai D.-Ch., Wu S.-H., Chou A.-H. et al. Long-Term immunogenicity studies of formalin-inactivated enterovirus 71 whole-virion vaccine in macaques. *Plos one www.plos one.org. 2014; September. vol. 9 issue: 1 – 5.*
38. Li L, Yin H, An Z, Feng Z. Consideration for developing an I strategy with immunization enterovirus 71 vaccine. *Vaccine.* 2015; 33: 1107 – 1112.
39. Zhu F.C., Meng F.Y., Li J.X., Mao Q.Y., Tao H. et al. Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2013; 381: 2024 – 2032.
40. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. *Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей.* Медицина. 2009: 345.
41. Бацкалевич Н.А. Клинические, иммунологические особенности и прогностическая оценка показателей врожденного и адаптивного иммунитета у подростков с энтеровирусным менингитом: Дис. ... канд. мед. наук. Екатеринбург; 2009: 130.
42. Фомин В.В., Чеснокова О.А., Ерман Б.А., Биткин Я.Б. Энтеровирусные инфекции у детей. Екатеринбург; 1991: 38 – 98.
43. Shuangsoo D., Niig G., Yaping L., Mei L., Xiufang W., Xiaoli J. et al. Dominant CD4-dependent RNA-dependent RNA polymerase – specific T-cell responses in children acutely infected with human enterovirus 71 and healthy adult controls. *Immunology.* 2013; 142: 89 – 100.
44. Blanchard-Rohner G., Pollard A.J. Long-term protection after immunization with protein – polysaccharide conjugate vaccine in infancy. *Rev.Vaccines-2011; 10 (5): 673-684/dol:10.1586/erv.11.14*
45. Вачаев Б.Ф., Яговкин Э.А., Онищенко Г.Г., Медуницын Н.В., Шепиков А.Л., Юрьева И.Л., Головина С.В., и др. Состояние и перспективы разработки отечественной вакцины против гемофильной инфекции. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2005; 3: 37 – 39.
46. Павлова Л.И., Вачаев Б.Ф., Русакова Л.А., Горбунова М.А., Яговкин Э.А., Чупринина Р.Л., Немировская Т.И. и др. Результаты клинических испытаний отечественной вакцины против гемофильной тип в инфекции. *Биопрепараты.* 2007; 4 (28): 12 – 15.
47. Вачаев Б.Ф., Юрьева И.П., Яговкин Э.А. и др. Разработка отечественной вакцины против гемофильной тип в инфекции. Актуальные вопросы инфекционной патологии сб. докладов юбилейной научно-практической конференции, посвященной 100 летию Ростовского НИИ микробиологии и паразитологии 23 – 24 сентября 2004 г. Ростов-на-Дону. 2004: 247 – 251.
48. Колесников А.В., Козырев А.В., Шемякин С.А., Дятлов И.А. Современные представления о механизме активации иммунного ответа конъюгированными полисахаридными вакцинами. *Журнал микробиологии.* 2015; 3: 97 – 106.
49. Баринская И.Ф., Ляшенко В.А., Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А., Сергеев О.В. Экспериментальные подходы к разработке мукозальных вакцин при вирусных заболеваниях, передающихся половым путем. *Иммунология.* 2013; 34 (2): 119 – 122.

50. Караулов А.В., Алешкин В.А., Воропаева Е.А., Метельская В.А., Слободенюк В.В., Афанасьев М.С. и др. Показатели колонизационной резистентности слизистых ротоглотки как объективные критерии мукозального иммунитета при бронхитах у детей. Иммунология. 2012; 33 (5): 255 – 259.
51. Zhang F., Hao Ch., Zhang Sh., Li I., Zhang Q., Wu W., Liu L., Li Ch. et al. Oral immunization with recombinant enterovirus 71VP1 formulated with chitosan protects mice against lethal challenge. *Virology Journal*.2014; 11(80): 3 – 9. Доступно на: <http://www.virology.com/content/11/1/80>

## References

- Onishchenko G.G., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A. Actual problems of vaksinoprofilaktika in the Russian Federation. *Journal Mikrobiologii [Journal Microbiology]*. 2011; 5: 110 – 114 (in Russian).
- [http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/StrategyWork/PEESP\\_ES\\_RUS\\_A4.pdf](http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/StrategyWork/PEESP_ES_RUS_A4.pdf)
- Seybil V.V., Malysheva L.P. Enteroviruses in XX – XXI centuries. *Journal Mikrobiologii [Journal Microbiology]*. 2005; 4: 83 – 89 (in Russian).
- Yashkulov K.B., Shevyreva M.N., Lazikova G.F., Jasinsky A.A., Kotova G.A., Chimidova R.I. The outbreak of enterovirus infections with serous meningitis in the Republic of Kalmykia and measures for its localization and liquidation. *Zdravooхранenie i sreda obitania [Public health and environment habitat]*. 2003; 5 (122): 12 – 18 (in Russian).
- Shindarov J., Chumakov M.P., Voroshilova M.K. Bojinov S., Vasilenko S.M., Iordanov I. et al. Epidemiological, clinical and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis like disease caused by enterovirus 71. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol.*1979; 23: 284 – 295
- Pokrovsky V.I. *Infectious diseases and epidemiology; 2007 (in Russian)*.
- Voroshilova M.K. Human enterovirus infection. Moscow; 1970: 295 – 340 (in Russian).
- Zhang D., Lu Yi., Lu Yi. Enterovirus 71 vaccine: close but still far. *International Journal of Infection Diseases*. 2010; 14: 749 – 743.
- Yu C.K., Chen C.C., Chen C.L., Wang J.R., Liu C.C., Yan J.J. et al. Neutralizing antibody provide protection against enterovirus type 71 lethal challenge in neonatal mice. *J. Biomed Sci*. 2000;7: 523 – 528.
- Lin Y.C., Wu C.N., Shin S.R., Ho M.S. Characterization of a vero-cell adapter virulent strain of enterovirus 71 suitable for use a vaccine candidate. *Vaccine*. 2002; 20: 2485 – 2495.
- Wu S.C., Liu C.C., Lian W.C. Optimization of micro carrier cell process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. *Vaccine*. 2004; 22: 3858 – 3964.
- Liu C.C., Lian W.C., Butler M., Wu S.C. High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free micro carrier vero-cell culture. *Vaccine*. 2007; 25: 19 – 24.
- Arita M., Ami Y., Wakita T., Shimizu H., Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus Sabine 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. *J. Virol*. 2007: 9386 – 9395.
- Arita M., Shimizu H., Nagata N., Iwata N., Ami Y., Suzaki Y., Sata et al. Temperature sensitive mutants of enterovirus monkeys. *J. Gen. Virol*. 2005; 86: 391 – 1401.
- Arita M., Nagata N., Iwata N., Ami Y., Suzaki Y., Mizuta K. et al. An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype A showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkey. *J. Virol*. 2007; 81: 9386 – 9395.
- Wu C.N., Lin Y.C., Fanu C., Liao N.S., Shih S.R., Ho M.S. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccine and inactivated virus. *Vaccine*. 2001; 20: 3858 – 3864.
- Xu L., He D., Li Zh., Zheng J., Yang L., Yu M. et al. Protection against lethal enterovirus 71 challenge in mice by recombinant vaccine Candidate containing a Broadly Cross-neutralizing epitope with the VP EF Loop. *Theranostics*. 2014; 4 (5): 498 – 502.
- Neglected Tropical Disease/ DOI:10.1371/Journal.pntd.0003692 April 9.2015: 1/22-21/22.
- Chen H.F., Chang M.H., Chiang B.L., Jeng S.T. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. *Vaccine*. 2006; 24: 2944 – 2951.
- Chen H.L., Huang J.J., Chu T.W., Tsai T.C., Huang C.M., Lin C.C. et al. Expression of VP1 protein in the milk of transgenic mice a potential oral vaccine protects against enterovirus 71 infection. *Vaccine*. 2008; 26: 2882 – 2889.
- Semenov B.F., Zverev V.V., Haitov R.M. Vaccine Prevention in the twenty-first century: the present and the future. *Immunology*. 2009; 30 (6): 324 – 335 (in Russian).
- Tung W.S., Bakaz S.A., Sekawi Z., Rosli R. DMA vaccine constructs against enterovirus 71 elicit immune response in mice. *Genet Vaccines Ther*. 2007; 5: 7.
- Wu C.N., Lin Y.C., Fanu C., Liao N.S., Shih S.R., Ho M.S. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccine and inactivated virus. *Vaccine*. 2001; 20: 3858 – 3864.
- Foo D.G., Macary P.A., Alonso S., Poh C.P. Identification of human CD4 T-cell epitopes on the VP1 capsid protein of enterovirus 71. *Virol Immunol*. 2008; 21: 213 – 224.
- Foo D.G., Macary P.A., Alonso S., Poh C.P. Identification of human CD4 T-cell epitopes on the VP1 capsid protein of enterovirus 71. *Virol Immunol*. 2008; 21: 213 – 224.
- Foo D.G., Alonso S., Chow V.T., Poh C.L. Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing elicited by syntetic peptide. *Microbes Infect*. 2007; 9: 1299 – 1306.
- Li Y.-X., Zhao H., Cao R.-Y., Deng Y.-Q., Han J.-F., Zhu Sh.-Ya. et al. et al. Recombinant tandem multi-linear neutralizing epitopes of human enterovirus 71 elicited protective immunity in mice. *Virology Journal*. 2014;11 (79): 2 – 8. Available at: <http://www.virology.com/content/11/1/79>.
- Karpenko L.I., Bajan S.I., Uzhachenko R.V., Nekrasova N.A., Lebedev L.R., Agafonov A.V. et al. Various forms of candidate vaccines against HIV-1 bearing polypeptide immunogens. *Biopreparati [Biodrugs]*. 2006; 4: 8 – 10 (in Russian).
- Hu Y.C., Hsu J.T., Huang J.H., Ho M.S., Ho Y.C. Formation of enterovirus-like particle aggregates by recombinant baculoviruses co-expressing P1 and 3CD in insect cells. *Biotechnol Lett*. 2003; 25: 919 – 925.
- Chung Y.C., Ho M.S., Wu J.C., Chen W.J., Huang J.H., Chou S.T. et al. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protect mice against lethal challenge. *Vaccine*. 2008; 26: 1855 – 1862.
- Tsou Y.-L., Lin Yi.-W., Shao H.-Yu., Yu Sh.-L., Wu Sh.-R., Lin H.-Yu. et al. Recombinant Adeno-vaccine expression enterovirus 71-like particles against Hand, Foot and Mouth Disease. *PLOS Neglected Tropical Disease/ DOI:10.1371/Journal.pntd.0003692 April 9.2015:1/22-21/22*.
- Zhao H., Li H.-Ya., Han Ji.-F., Deng Yo.-Q., Zhu Sh.-Ya., Li X.-F. et al. Novel recombinant chimeric virus-like particle is immunogenic and protective against bothe enterovirus 71 coxsackievirus A16 in mice. *Scientific Reports [5:7878] DOI:10.1038/s 07878 Pub 19 January 2015: 1 – 7*.
- Lin Yu.-L., Hu Yu.-Ch., Lian Ch.-Ch., Lin Sh.-Ye., Liang Yu.-Ch., Yuan H.P. et al. Enterovirus-like particles induce the activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells through TLR4 signaling. *Plos one/www.plosone. orgOctober 2014/volume 9/issue 10/e1111u96: 1 – 11*.
- Chai O.K., Shamala D., Jam C.M., Thong W.K. Formaldehyde-inactivated whole –virus vaccine Protects a Murine Model of enterovirus 71 Encephalomyelitis against Disease. *Journal of virology*. 2010; January: 661 – 665.
- Chou Ai.-H., Liu Ch.-Ch., Chang Gh.-Peng., Guo M.-Sh., Hsieh Sh.-Yu., Yung W.-H. et al. Pilot scale production of Highly efficacious and stable enterovirus 71 vaccine candidates. *Plos one www.plosone.org 2012; v7.April: 1 – 9*.
- Hwu Shi.-H., Lu Y.A., Brewoo J., Partidos C.D., Osorio J.E., Santangelo J.D. Preclinic evolution of the Immunogenicity and Safety of an Inactivated Enterovirus 71 candidate vaccine. *Plos Neglected Tropical Diseases www.plosntds.org 2013; 7: 1 – 7*.
- Liu Ch.-Ch., Hwang Ch.-S., Yang W.-S., Tsai D.-Ch., Wu S.-H., Chou A.-H. et al. Long-Term immunogenicity studies of formalin-inactivated enterovirus 71 whole-virion vaccine in macaques. *Plos one www.plos one.org. 2014; 9: 1 – 5*.
- Li L., Yin H., An Z., Feng Z. Consideration for developing an I strategy with immunization enterovirus 71 vaccine. *Vaccine*. 2015; 33: 1107 – 1112.
- Zhu F.C., Meng F.Y., Li J.X., Mao Q.Y., Tao H. et al. Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjutant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2013; 381: 2024 – 2032.
- Haitov R.M., Pinegin B.V., Yarinin A.A. Manual of clinical immunology. Diagnosis of diseases of the immune system: a manual for doctors. *Medicine*. 2009: 345 (in Russian).
- Batskalevich N.A. Clinical, immunological characteristics and prognostic evaluation of indicators of innate and adaptive immunity in adolescents with enteroviruses meningitis. Doctorate of med. sci. diss. Ekaterinburg; 2009: 130 (in Russian).
- Fomin V.V., Chesnokova O.A., Erman B.A., Bitkin I.B. Enterovirus infection in children. Ekaterinburg; 1991: 38 – 98 (in Russian).
- Shuangsoo D., Niig G., Yaping L., Mei L., Xiufang W., Xiaoli J. et al. Dominant CD4-dependent RNA-dependent RNA polymerase – specific T-cell responses in children acutely infected with human enterovirus 71 and healthy adult controls. *Immunology*. 2013; 142: 89 – 100.
- Blanchard-Rohner G., Pollard A.J. Long-term protection after immunization with protein – polysaccharide conjugate vaccine in infancy. *Rev. Vaccines-2011; 10 (5): 673 – 684/doi:10.1586/erv.11.14*.
- Vachaev B.F., Yagovkin E.A., Onishchenko G.G., Medunitsin N.V., Shepikov A.L., Yaryeva I.L. et al. The state and prospects the development of the domestic vaccine against Haemophilus influenzae type b infection. *Epidemiologia i infekcionnoje bolezni.[Epidemiology and infectious diseases]*. 2005; 3: 37 – 39 (in Russian).



46. Pavlova L.I., Vachaev B.F., Rusakova L.A., Gorbunova M.A., Yagovkin E.A., Chuprinina R.L., Nemirovskaya T.I. and et al. The results of clinical trials of a vaccine against Haemophilus influenzae type b infection. Biopreparati [Biodrugs]. 2007; 4 (28): 12 – 15.
47. Vachaev B.F., Yaryeva I.L., Yagovkin E.A. et al. Development of domestic vaccine against Haemophilus influenzae type in infection. Actual problems of infectious pathology coll. reports jubilee scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of the Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, 23 – 24 September 2004 Rostov-on-Don: 247 – 251 (in Russian).
48. Kolesnikov A.V., Kozyrev AV, Shemyakin S.A., Dyatlov I.A. Modern ideas about the mechanism of activation of the immune response polysaccharide conjugated vaccines. Jurnal mikrobiologii [Journal Microbiology]. 2015; 3: 97 – 106.
49. Barinskaja I.F., Lyashenko V.A., Alimbarova L.M., Lazarenko A.A., Sergeev O.V. Experimental approaches to the development of mucosal vaccines for viral diseases, sexually transmitted. Immunologia [Immunology]. 2013; 34 (2): 119 – 122 (in Russian).
50. Karaulov A.V., Aleshkin V.A., Voropaeva E.A., Metelskaya V.A., Slobodenyuk V.V. Afanasiev M.S. et al. Indicators mucous oropharyngeal colonization resistance as the objective criteria of mucosal immunity in case of bronchitis in children. Immunologia [Immunology]. 2012; 33 (95): 255 – 259 (in Russian).
51. Zhang Fushun., Hao Chunsheng., Zhang Shuo., Li Iqian., Zhang Quanfu., Wu Wei. et al. Oral immunization with recombinant enterovirus 71VP1 formulated with chitosan protects mice against lethal challenge. Virology Journal 2014; 11 (80): 3 – 9. Available at: <http://www.virology.com/content/11/1/80>.

## Изучение иммуногенных свойств термоэкстрактов из бруцелл в S- и I-формах на морских свинках

Л.М. Михайлов, Н.Л. Баранникова, Л.Е.Токарева, С.А. Витязева, Т.П. Старовойтова, В.И. Дубровина (dubrovina-valya@mail.ru), С.В. Балахонов

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (adm@chumin.irkutsk.ru)

### Резюме

Дана сравнительная оценка действия термоэкстрактов *Brucella abortus* I-206 в S- и L-формах при формировании иммунного ответа у морских свинок. Показано, что иммунный статус и индекс инфицированности экспериментальных животных, зараженных вирулентными культурами бруцелл, зависит от иммунизирующей дозы вводимого препарата. Иммунизация экспериментальных животных термоэкстрактом *B. abortus* I-206 в S-форме, а также при сочетанном применении термоэкстрактов в S- и L-формах с последующем заражением *B. abortus* 544 и *B. melitensis* I-203, способствовала снижению индекса инфицированности.

**Ключевые слова:** термоэкстракты, S- и L-формы, бруцеллы, индекс инфицированности

### Studying of S- and L- form *Brucella's* Thermo-Extracts Immunogenic Characteristics at Cavies Guinea Pigs

L.M. Mikhailov, N.L. Barannikova, L.E.Tokareva, S.A. Vityazeva, T.P. Starovoytova, V.I. Dubrovina (dubrovina-valya@mail.ru), S.V. Balakhonov

Federal Budgetary Healthcare Facility «Irkutsk Anti-plague Research Institute» of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, adm@chumin.irkutsk.ru

### Abstract

**Relevance.** In the Russian Federation is noted the negative dynamics of epizootic process of brucellosis among epidemiologically important species of farm animals (cattle and small ruminants), which represents a threat to the population. Used in Russia live vaccine based on a strain of *Brucella abortus* 19 the BA has reduced virulence, but capable at high doses (108 – 2 109 m.c.) cause a generalized infection in guinea pigs and humans, and in violation of the rules cause post-vaccination complications.

**Goal.** Assess possibility of the thermo-extract derived from the S- and L-forms of *Brucella*, get an immune response in guinea pigs, and reduce the risk of infection with virulent *brucella*.

**Materials and methods.** Two series of experiments were carried out on guinea pigs. Immunized guinea pigs thermo-extracts (TE) from a strain of *B. abortus* I-206 in the S- and L-forms, and live brucellosis vaccine (Scientific and Production Association for Immunological Preparations «Microgen», Russia). To infect guinea pigs using virulent *B. abortus* 544 (Reference) and *B. melitensis* I-203 from the museum of living cultures of the Irkutsk Scientific Research Anti-Plague Institute.

**Results.** In the first and second experiment after immunization L TE in dose 5 mg and 10 mg after infection with *B. abortus* and *B. melitensis* 544 I-203 were approximately similar results. Immunization of *Brucella* in TE S-form or complex of L + S TE either of two doses (5 mg or 10 mg) cultures after infection *B. abortus* and *B. melitensis* 544 I-203 gave the same result as a vaccine *B. abortus* 19VA.

**Conclusions.** The results indicate the prospects of further study of experimental steps for using immunizing agents TE S, L TE and TE S + L on the laboratory animals.

**Keywords:** thermo-extracts, S- and L-forms, *Brucella*, infection rate

### Введение

Эпидемиологическая и эпизоотологическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации

характеризуется как напряженная, что связано с негативной динамикой эпизоотического процесса среди эпидемически значимых видов сельско-