

## РОЗРОБКА ВАКЦИН ІЗ НОЗОКОМІАЛЬНИХ ШТАМІВ *P. AERUGINOSA* ДЛЯ ПРОФІЛАКТИЧНОЇ ІМУНІЗАЦІЇ ГРУП РИЗИКУ В УМОВАХ ВОЄННОГО СТАНУ

Світлана Деркач, Наталія Куцай, Надія Скляр,  
Анатолій Марющенко, Валентина Дяченко

Інститут мікробіології та імунології  
ім. І.І. Мечникова Національної академії  
медичних наук України

До найбільш відомих збудників внутрішньо-лікарняних інфекцій відноситься синьогнійна паличка - *P. aeruginosa*, яка майже повсюдно займає перше місце в етіології нозокоміальних пневмоній та інших гнійно-септичних інфекцій з високим рівнем летальності [ 1,2 ]. Основною проблемою у боротьбі з нозокоміальними інфекціями є стрімке поширення резистентності збудника до протимікробних препаратів, що призводить до ускладнень та зростання тяжкості перебігу захворювання, зниження ефективності терапії, надмірного здороження і тривалості лікування. Особливого значення проблема адекватної терапії та профілактики гнійно-запальних ускладнень, зумовлених нозокоміальними штамми, набуває в умовах воєнних дій.

Структура нозокоміальних інфекцій у стаціонарах різного профілю досить відрізняється, однак і *P. aeruginosa*, *A.baumannii* та *K.pneumoniae* являються найбільш значимими у порівнянні з іншими видами неферментуючих грам негативних полірезистентних бактерій, оскільки домінують серед пацієнтів незалежно від віку, категорії поранення, від спеціалізації лікувального закладу [ 3,4,5 ].

До факторів, які зумовлюють їх особливе місце у виникненні нозокоміальних інфекцій, відноситься висока стійкість до несприятливих факторів зовнішнього середовища, здатність виживати на сухих поверхнях, контамінуючи прибори, інструменти, руки медичного персоналу, тобто адаптуватись до умов лікарняного середовища. Ще одна особливість – наявність цілого ряду факторів вірулентності, які сприяють колонізації тканин організму, цитотоксична дія, здатність до продукції екзотоксину, до персистенції у біоплівках [ 6 ]. У біоплівках мукоїдна оболонка обволікає бактерії глікокаліксом, що робить їх невразливими для антибіотиків і дезінфектантів і забезпечує між штамми обмін генами, які відповідають за чутливість до антибактерійних препаратів.

Зростання показників внутрішньолікарняних захворювань особливо зростає в умовах воєнних дій. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) у 44,0 – 61,0 % [ 4 ]. поранених розвиваються інфекційні ускладнення.

За період 2018-2020 роки в Україні в зоні проведення операцій об'єднаних сил (ООС) у осіб з вогнепальними пораненнями гнійносептичні ускладнення виникали у 50-75 % випадків % [ 4,7 ].

Більшість клініцистів звертає увагу на виникнення у бійців передової, особливо в осінньо-зимовий період, інфекційних захворювань верхніх дихальних шляхів, бактеріальних пневмоній, гайморитів тощо. На сьогодні не існує узагальненого інформативного аналізу досліджень мікрофлори, яка зумовлює розвиток таких ускладнень, щодо динаміки її змін під час лікування та впливу цих змін на швидкість одужання та повернення до строю [ 8 ].

У доступній літературі опубліковані поодинокі результати досліджень з цього питання. Так, у докторській дисертації Кондратюка В.М., проаналізований мікробний спектр мікроорганізмів, виділених у ході воєнних дій в Україні [ 9]. Отримані дані вказують на певні закономірності у змінах бактеріології бойової рани. Первинна контамінація рани відбувається, в основному, коменсалами ґрунту, але в подальшому багатоетапна медична евакуація з перебуванням поранених у різних медичних закладах зумовлюють інфікування госпітальними антибіотикорезистентними штамми бактерій і поширення стійких до антибіотиків мікроорганізмів у закладах медичного забезпечення.

Незважаючи на відсутність багатоцентрових даних про долю таких інфекцій у період воєнних дій, пов'язаних з пораненнями і госпіталізацією, довготривалим перебуванням бійців у шпитальних умовах, що сприяють інфікуванню і захворюванню на НП, актуальність боротьби з зумовленими ними ускладненнями не викликає сумніву. ВООЗ віднесло види роду

*P. aeruginosa* та *A.baumannii* «до списку провідних критичних патогенів, що несуть загрозу здоров'ю людству», а розробку засобів боротьби з ними – до важливих та актуальних.

Вчені різних країн закликають докласти зусиль до розробки профілактичних вакцин для боротьби з інфекціями, які набувають все більш агресивного характеру. Проблему боротьби з нозокоміальними інфекціями, зумовленими умовно-патогенними мікроорганізмами, можна розділити на кілька складових: по-перше – лікування при наявності клінічних проявів захворювання; по друге – екстрена профілактика викликаних ними ускладнень (особливо при зниженні захисних сил організму у пацієнтів з пораненнями, опіками, з відкритими травмами, при інвазивних методах лікування); втретє – профілактика зараження нозокоміальними антибіотикорезистентними штамми збудника груп ризику (хворі в реанімаційних, хірургічних, опікових відділеннях; пацієнти перед плановим хірургічним втручанням, протезуванням, тощо).

В перших двох випадках потрібно застосовувати антибіотики, бактеріофаги, імунні препарати, що здатні швидко формувати імунітет,

який є специфічним, хоча і недовготривалим - антитоксичні сироватки, лізати, аутовакцини. У третьому випадку також можна застосовувати вакцинний препарат, але на сьогоднішній день таких всебічно вивчених нешкідливих високоєфективних засобів імунізації відносно *P. aeruginosa* не впроваджено.

Отримання єдиної мультиштамової вакцини та включення вакцинації до календарних щеплень не має обґрунтованої доцільності, оскільки збудники є опортуністичними до того ж характеризуються широкою сероваріабельністю. Саме тому, вважаємо найбільш перспективним виготовлення вакцин зі шпитальних штамів (далі – шпитальних вакцин). Штами-кандидати повинні бути циркулюючими локальними полірезистентними нозокоміальними штамми, вилученими від хворих в осередках інфекції, зокрема при вентилятор-асоційованій пневмонії.

Ефективність вакцин та їх нешкідливість залежить, в основному, від способу отримання, в основі якого є метод знезараження штамів-кандидатів. Використання традиційних методів, коли вилучаються окремі антигени із бактеріальної клітини, не дало відчутних переваг один перед одним, тому пошук нових підходів до створення імунних препаратів, продовжується в різних країнах світу. В Україні застосування вакцинних препаратів для профілактики та лікування інфекцій, зумовлених *P. aeruginosa* та відсутнє.

Успішна розробка таких імунобіологічних препаратів для боротьби з розповсюдженням антибіотикорезистентних нозокоміальних штамів-збудників гнійно-запальних інфекцій є досить перспективною для застосування їх для імунопрофілактики та вакцинотерапії, як у воєнний, так і в мирний післявоєнний час.

В інституті мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова упродовж попередніх років проводились дослідження, в основі яких був пошук засобів боротьби з синьогнійною інфекцією, у тому числі, розробка специфічних імунопрепаратів [10,11,12].

Впродовж останніх років нами розроблено та модифіковано спосіб знезараження вакцинних штамів-кандидатів (на моделі *P. aeruginosa*) з використанням фотодинамічного методу, що дозволяє максимально зберігати без змін антигенний склад білкових компонентів, селективно руйнуючи РНК та ДНК бактеріальних клітин, забезпечуючи, тим самим, специфічну імуногенність та низьку реактогенність імунобіологічного препарату. Був розроблений та запатентований спосіб отримання вакцин із застосуванням специфічних бактеріофагів та новітнього методу фотодинамічної інактивації бактерій *P. aeruginosa* з використанням у якості ендогенних фотосенсибілізаторів рибофлавіну (7,8-диметіл-10 рибітілоаллоксазін) та вікасолу (вітамін К) з наступним опроміненням світлом фотополімерної лампи та ультрафіолетовим опроміненням [13].

З урахуванням ефективності таких вакцин з одного боку та певних проблем при їх виготовленні з іншого, була модифікована технологія отримання аутовакцин та шпитальних моновакцин із циркулюючих нозокоміальних штамів синьогнійної палички [14].

**Мета дослідження.** Аналітично-експериментальне обґрунтування актуальних напрямків удосконалення імунопрофілактики та вакцинотерапії синьогнійної інфекції в умовах воєнного стану.

#### Матеріалі і методи

Для експериментів були задіяні 5 зразків моно- та комплексних синьогнійних вакцин, отриманих із застосуванням модифікованого (запатентованого) фотодинамічного способу; 160 білих безпорідних мишей масою 18-20грам, які утримувались у віварії ДУ ІМІ НАМН у стандартних умовах; нозокоміальні штами *P. aeruginosa*.

Всі експерименти виконувались у трикратному повторенні у відповідності до міжнародних правил (Директива 86/609/ЕЕС) та Правил роботи з тваринами (затверджені Комітетом з біоетики ДУ ІМІ НАМН).

Протективні властивості вакцинних зразків вивчені на лабораторних тваринах шляхом введення по 0,2 мл підшкірно, а бо по 0,5 мл внутрішньочеревно. Контрольне зараження здійснювали гомологічними та гетерогенними штамми *P. aeruginosa* з визначенням показників LD<sub>50</sub> та виживаності. В якості контрольної групи використовували невакцинованих мишей.

Для вивчення ефективності вакцинотерапії використовували білих безпородних мишей, яким вводили інфікуючу дозу культури *P. aeruginosa*, що дорівнювала 6 LD<sub>50</sub> внутрішньочеревно.

Інфікованим тваринам уже на наступний день вводили мультиштамову вакцину у дозі 0,2 мл підшкірно, повторюючи ін'єкції на 3 та 7 день. Це варіант визначення протективної активності вакцинотерапії для інфікованих (при носійстві, можливо для персоналу, що контактує з хворими). Частині інфікованих тварин також вводили мультиштамову вакцину, але в більших дозах (0,5 мл) внутрішньочеревно на 5 та 7 день від моменту інфікування на фоні уже клінічно розвиненої синьогнійної інфекції. Третя група мишей була контрольною, тваринам якої після інфікування аналогічними дозами культури *P. aeruginosa* вакцина не вводилась. Ефективність вакцини оцінювали за показниками виживаності дослідних тварин.

Отримані результати досліджень оброблено методом варіаційної статистики за допомогою програми MS Excel 2003 з використанням критерію  $\chi^2$  та однофакторного дисперсійного аналізу ( $p < 0,05$ ).

**Ключові слова:** синьогнійна інфекція, нозокоміальні штами *P. aeruginosa*, фотодинамічна інактивація збудника, імунопрофілактика, аутовакцинотерапія

### Результати досліджень.

Ефективність вивчалась при парентеральному введенні препарату шляхом підшкірної та внутрішньочеревної вакцинації. Експериментальні дослідження підтвердили протективну ефективність отриманих зразків синьогнійної вакцини та її можливе застосування при імунoproфілактиці та аутовакциноtherapiї.

Експериментально підтверджена здатність аутовакцин, отриманих фото динамічним способом, захищати лабораторних тварин від зараження. Показники  $LD_{50}$  у порівнянні з контрольною невакцинованою групою були достовірно вищими ( $p < 0,05$ ). Індекс ефективності (ІЕ) при цьому дорівнював 3,4 – 7,0. Летальність у групах піддослідних мишей не перевищувала 20%, в той час як у контрольній групі вона складала близько 80%. [16].

Показники протективної активності мультиштамових вакцинних зразків із нозокоміальних штамів коливались від 78,6% до 88,9%, а в контролі – від 18,8% до 22,2%. Певні відмінності в показниках ефективності вакцинації можуть залежати від вихідної вірулентності та імуногенності штаму, застосованого для зараження, від його серотипової тотожності вакцинному штаму.

В експерименті вивчено перспективність застосування аутовакцин при лікуванні мишей, попередньо інфікованих гомологічними штамми

*P. aeruginosa*. Показники виживання при цьому склали 71,8%, тобто були у три рази вищі у порівнянні з контрольною групою. Більше того, навіть при відсутності повного одужання, лікування аутовакциною суттєво подовжувало їх життя (до 20 – 30 днів) та зменшувало ступінь клінічних симптомів захворювання.

Введення дослідним тваринам так званої шпитальної вакцини, приготовленої з кількох актуальних госпітальних штамів *P. aeruginosa*, навіть у період наявності клінічних проявів інфекції (на 3-7 й день після зараження) також було ефективним, оскільки кількість загиблих тварин була достовірно меншою, ( $p < 0,001$ ) (Див. таб.).

Отримані результати засвідчили, що розроблені даним способом синьогнійні вакцини можуть бути рекомендовані для лікування синьогнійної інфекції [10,15,16].

Розробка нового способу отримання вбитої, нешкідливої та високоефективної вакцини на основі аутоштамів (або локально циркулюючих внутрішньолікарняних штамів) може сприяти зниженню показників захворюваності, летальності, різних ускладнень при пораненні та зменшенню циркуляції антибіотикорезистентних штамів.

Не менш перспективним, на наш погляд, є визначення можливості відійти від травматичного методу імунізації, замінивши його мукозальним.

**Таблиця . Показники протективної активності дослідної мультиштамової вакцини, застосованої у якості аутовакциноtherapiї інфікованим культурою *P.aeruginosa* тварин**

група	Вижило тварин :	Загинуло:	Усього :
Тварини, клінічно хворі на синьогнійну інфекцію, які отримували аутовакциноtherapiю	15	5	20
Тварини, клінічно хворі на синьогнійну інфекцію, які не отримували аутовакциноtherapiю	2	18	20
Всього	17	23	40

Примітка : Значення критерію  $\chi^2$  складає 17.289. Критичне значення  $\chi^2$  при рівні значимості  $p=0.01$  складає 6.635. Рівень значимості  $p<0,001$ . Різниця між групами статистично значима.

Це особливо актуально в умовах воєнного часу при імунізації постраждалих внаслідок бойових дій, особливо з метою профілактики вентилятор-асоційованих пневмоній. Оскільки саме дихальні шляхи є місцем проникнення патогену, то вакцино-опосередкований захист повинен бути націлений саме на дихальні шляхи [17].

Крім того, мукозальні вакцини мають безліч переваг перед традиційною системною вакцинацією [18]. Серед основних переваг місця введення через слизову оболонку, як правило, є легкодоступність та значна васкуляризація, що дозволяє швидко поглинати антиген та стимулювати всі гілки імунної системи — синтез антигенспецифічного IgA на слизовій оболонці, системного IgG та інших клітинно-опосередкованих відповідей. Наявність

«загальної імунної системи слизової оболонки» забезпечує імунну відповідь на ділянках, віддалених від місця введення вакцини.

### Висновок

Аналітичний аналіз захворюваності нозокоміальними інфекціями та проблем боротьби з ними в умовах воєнного стану, а також результатів власних досліджень, дозволяє окреслити напрямки удосконалення засобів імунoproфілактики та вакциноtherapiї синьогнійної інфекції. Таким чином, подальше вивчення особливостей отримання вакцинних препаратів та їх застосування у практиці, особливо в період воєнних дій, є актуальним і перспективним. Відпрацьований на моделі синьогнійної палички спосіб отримання імуногенів

може бути успішним при розробці вакцин і з інших бактерій-збудників гнійно-запальних захворювань ( ацинетобактера, протейної чи кишкової палички , стафілококів, тощо) та перспективним для конструювання комбінованих вакцинних препаратів. Це сприятиме підвищенню ефективності боротьби з нозокоміальними інфекціями як у воєнний, так і у мирний післявоєнний час.

#### **Development of vaccines from nosocomial strains of *P. aeruginosa* for preventive immunization of risk groups in the conditions of war**

**Svitlana Derkach, Nataly Kutsai, Nadiya Sklyar, Anatoly Maryushchenko, Valentina Dyachenko**

The problem of adequate therapy and prevention of purulent-inflammatory complications caused by nosocomial strains acquires special importance in the conditions of military operations. The structure of nosocomial infections in hospitals of different profiles is quite different, but *P. aeruginosa* is the most significant pathogen. To date, comprehensively studied harmless highly effective means of combating blue pus infection, including specific vaccines, have not been implemented. We consider the production of immunostimulating drugs from hospital strains (hereinafter - hospital vaccines) to be the most promising. Candidate strains should be circulating local polyresistant nosocomial strains, extracted from patients in foci of infection, in particular, with ventilator-associated pneumonia. **The aim of the study.** Analytical-experimental substantiation of current areas of improvement of immunoprophylaxis and vaccine therapy of pyogenic infection in the conditions of martial law. **Materials and methods.** Analysis of professional literary sources of information. Experimental study of vaccine samples from nosocomial strains of *P. aeruginosa*, obtained by the photodynamic method (5 samples), on purebred white mice (160 animals), which were kept in the vivarium of the Institute of Medical Sciences of the National Academy of Medical Sciences under standard conditions. All experiments were performed in triplicate in accordance with international rules (Directive 86/609/EEC) and Rules for working with animals (approved by the Committee on Bioethics of the State University of IMI of the National Academy of Sciences of the Russian Academy of Sciences). The protective properties of vaccine samples were studied on laboratory animals by administering 0.2 ml subcutaneously or 0.5 ml intraperitoneally. Control infection was carried out with homologous and heterogeneous strains of *P. aeruginosa* with determination of LD 50 and survival rates. To study the effectiveness of vaccine therapy, a group of mice was injected with an infectious dose of *P. aeruginosa* culture, and the next day - a multi-strain vaccine in a dose of 0.2 ml subcutaneously, repeating the injections on the 3rd and 7th day. Non-vaccinated mice were used as a control group. The obtained research results were processed by the method of variational statistics using the MS Excel 2003 program using the x2 criterion and univariate variance analysis ( $p \leq 0.05$ ).

**Research results.** The effectiveness of the developed vaccine samples was studied when the drug was administered parenterally to laboratory animals by subcutaneous and intraperitoneal vaccination. Experimental studies have confirmed the protective effectiveness of the obtained samples of blue pus vaccine and its possible use in immunoprophylaxis and autovaccine therapy. Indicators of protective activity of multistrain vaccine samples from nosocomial strains varied from 78.6% to 88.9%, and in the control - from 18.8% to 22.2%. The experiment studied the prospects of using autovaccines in the treatment of mice previously infected with homologous strains of *P. aeruginosa*. At the same time, the survival rates were 71.8%, that is, they were three times higher than in the control group. Moreover, even in the absence of complete recovery, treatment with autovaccine significantly extended their life (up to 20-30 days) and reduced the degree of clinical symptoms of the disease. The introduction of the so-called hospital vaccine prepared from several actual hospital strains of *P. aeruginosa* into experimental animals, even during the presence of clinical manifestations of infection (on the 3rd-7th day after infection), was also effective, since the number of dead animals was significantly lower ( $x_2 < 0, 05$ ). The obtained results proved that blue-pus vaccines developed in this way can be recommended for the treatment of blue-pus infection [10,15,16]. In our opinion, it is no less promising to determine the possibility of moving away from the traumatic method of immunization, replacing it with a mucosal one. This is another direction of research, which is especially relevant in wartime conditions, for victims of hostilities with the aim of preventing ventilator-associated pneumonia. **Conclusion.** Analytical analysis of the incidence of nosocomial infections and the problems of combating them in the conditions of martial law, as well as the results of own research, allows us to outline the directions for improving the means of immunoprophylaxis and vaccine therapy of pyelonephritis. The method of obtaining immunogens developed on the *Pseudomonas aeruginosa* model can be successful in the development of vaccines also from other bacteria-causing purulent-inflammatory diseases (*Acinetobacter*, *proteus* or *Escherichia coli*, staphylococci, etc.) and promising for the construction of combined vaccine preparations. This will contribute to increasing the effectiveness of the fight against nosocomial infections in both wartime and peaceful postwar times.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, nosocomial strains, vaccines, war condition

#### **References**

1. Markovich IG, Markovich IF Infectious diseases, epidemic risks, epidemiological surveillance in modern conditions of Ukraine. *Infectious diseases 2024*; 2 ;(116) 4-13.
2. Deziel E, Comeau Y, Villmur AR Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly

- adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motility  
*Bacteriol.* 2001; 183; 4 1195-1204.
3. Kovalchuk PV, Kondratiuk MV Bacterial flora of combat wounds from eastern Ukraine and time-specified changes of bacterial recovery during treatment in Ukrainian military hospital. *BMC Res. Notes*. 2017; 10: 152.
  4. Kondratyuk V.M. microbiological characteristics of infectious complications of combat wounds in various armed conflicts. *Ukraine journal honey. biological sport*. 2017; 3(7): 219–223.
  5. Khomenko IP, Tsema EV, Shapovalov VYu. etc. dynamics of microbial contamination of a gunshot wound during complex surgical treatment. *Surgery of Ukraine*. 2018; 1: 7–13.
  6. Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M new treatment options against gram-negative organisms *Crit Care* 2011. 15(2): 215.
  7. Global strategy of the WHO to contain resistance to antimicrobial drugs  
[http://www.who.int/drugresistance/WHO Global Strategy Russian.pdf](http://www.who.int/drugresistance/WHO%20Global%20Strategy%20Russian.pdf)
  8. Fomin OO, Fomina NS, Kondratyuk VM, Kolodiy SA characterization of the effectiveness of treatment of gunshot wounds using VAC therapy. *Visn. Vinnytsia national honey. Univ.*2020. 24(1): 106–109.
  9. Kondratyuk VM microbiological substantiation of the new concept of antimicrobial therapy of infectious and inflammatory complications of combat wounds in the modern armed conflict. UDC: 355.01;582.23:616-08Diss. doctor of medical sciences. 2020
  10. Priebe GP, Goldberg JB vaccines for *Pseudomonas aeruginosa*: a long and winding road. *expert rev. vaccines* 2014. 13(4). 507–19.
  11. Vincent JL vaccine development and passive immunization for *Pseudomonas aeruginosa* In *Critically Ill Patients: A Clinical Update*. *Future Microbiol.* 2014. 9(4) 457–63.
  12. Giedrys-Kalemba S, Czernomysy-Furowicz D, Fijałkowski K, Jursa-Kulesza J autovaccines in individual therapy of Staphylococcal infections. In *pet-to-man traveling Staphylococci*. Academic Press. 2018. 253-264.
  13. Derkach SA, Martynov AV, Kutsai NM, Horodnytska NI the method of obtaining a vaccine for the prevention and treatment of pseudomonosis. Utility model patent No. 1432248 dated 07/27/2020 5.
  14. Derkach SA, Martynov AV, Kutsai NM, Horodnytska NI the technology of obtaining autovaccines for the treatment of pyogenic infection and prevention of nosocomial pseudomonosis. State registration number 0120U100719. 2022. 4.
  15. Methodological instructions for the application of unified microbiological (bacteriological) research methods in clinical and diagnostic laboratories. Appendix 1 to Order of the Ministry of Health of the USSR 535 of April 22, 1985; 45.
  16. SA Derkach, NM Kutsai, NI Sklyar, IA Voronkina, VF Dyachenko experimental study of pyelonephritis autovaccines obtained by a modified photo dynamic method. *Infectious diseases*. 2024. 2 (116) 40-44.
  17. Savenkova MS, Afanasyeva AA, Minasyan VS, Tyuryna SI prevention and treatment of respiratory diseases in frequently ill children with topical bacterial lysates. *Questions of modern pediatrics* 2009. 8. 6. 18-25.
  18. Kumar P, Chen K, Kolls JK th 17 cell-based vaccines in mucosal immunity. *Curr Opin Immunol*. 2013. 25: 373-80. 10.1016/j.coi.2013.03.011