

## ИЗУЧЕНИЕ ЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ (ВПЧ), СОДЕРЖАЩИХ НА ВИРУСА ГРИППА, В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ ПОСТГРИППОЗНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ, ВЫЗВАННОЙ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Глубокова Е.А., Ленева И.А., Фалынскова И.Н., Поддубиков А.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Резюме.** В настоящее время актуальной остается проблема пневмоний, возникающих в результате послегриппозной инфекции. Так, например, на данный момент практически отсутствуют исследования роли иммунного ответа к нейраминидазе в регуляции восприимчивости организма к бактериальной суперинфекции после гриппозной инфекции. Одно из новых и перспективных направлений в современной вирусологии для разработки противогриппозных вакцин и изучения белков вируса гриппа – это создание вирусоподобных частиц. При этом возможно получение вирусоподобных частиц, несущих отдельные белки вируса гриппа, такие как нейраминидаза и гемагглютинин. Это позволяет более подробно рассмотреть возможную роль отдельных белков вируса гриппа в иммунном ответе организма как на вирус гриппа, так и на возможное развитие вторичной бактериальной пневмонии. Цель данного исследования – изучение иммунного ответа к белку вируса гриппа нейраминидазе в формировании резистентности к вторичной бактериальной пневмонии с использованием вирусоподобных частиц, несущих нейраминидазу. Для этих целей нами была использована экспериментальная модель вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *Staphylococcus aureus*, после гриппозной инфекции. Животных предварительно вакцинировали вирусоподобными частицами, несущими нейраминидазу, гемагглютинин или все вместе (коктейль вирусоподобных частиц). Для создания выбранной модели животных заражали спустя 21 день вирусами гриппа А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1) и реассортантом N1BRG-121хр (А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009)Х А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1), содержащий поверхностные белки гемагглютинина и нейраминидазы от вируса А/Калифорния/04/2009, а внутренние белки от А/Пуэрто Рико/8/34. Спустя 5 дней после вирусного заражения мышей инфицировали *Staphylococcus aureus*. Кроме того, одновременно с вакцинацией одну группу животных заражали А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1), после чего на 21-й день заражали реассортантным вирусом N1BRG-121хр. Протективную активность вакцин оценивали по уменьшению снижения массы тела, выживаемости и продолжительности жизни мышей. Полученные результаты показали, что вирусоподобные частицы, содержащие нейраминидазу, не проявляют протективных свойств. Однако коктейль вирусоподобных частиц, содержащий гемагглютинин и нейраминидазу, значительно повы-

### Адрес для переписки:

Глубокова Екатерина Андреевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»  
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.  
Тел.: 8 (916) 588-55-89.  
E-mail: eaglubokova@yandex.ru

### Address for correspondence:

Glubokova Ekaterina A.  
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera  
105064, Russian Federation, Moscow,  
Malyy Kazenny lane, 5a.  
Phone: 7 (916) 588-55-89.  
E-mail: eaglubokova@yandex.ru

### Образец цитирования:

Е.А. Глубокова, И.А. Ленева, И.Н. Фалынскова,  
А.В. Поддубиков «Изучение защитной эффективности  
вирусоподобных частиц (ВПЧ), содержащих НА  
вируса гриппа, в мышинной модели постгриппозной  
бактериальной пневмонии, вызванной *Staphylococcus  
aureus*» // Российский иммунологический журнал, 2020.  
Т. 23, № 4. С. 389-394.  
doi: 10.46235/1028-7221-441-EPF  
© Глубокова Е.А. и соавт., 2020

### For citation:

E.A. Glubokova, I.A. Leneva, I.N. Falinskova,  
A.V. Poddubikov “Examining protective efficacy of influenza  
virus NA-containing virus-like particles (VLP) in mouse  
model of post-influenza bacterial pneumonia caused by  
*Staphylococcus aureus*”, Russian Journal of Immunology/  
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 4,  
pp. 389-394.  
doi: 10.46235/1028-7221-441-EPF  
DOI: 10.46235/1028-7221-441-EPF

шает защиту животных от смертности и снижает потерю массы тела. Было показано, что увеличение вирусоподобных частиц с содержанием нейраминидазы в коктейле вирусоподобных частиц (вирусоподобные частицы с содержанием нейраминидазы+гемагглютинин) приводит к повышению протективного эффекта вакцинации, который был сравним с эффективностью или превосходил таковую у мышей с постинфекционным иммунитетом.

*Ключевые слова:* вирус гриппа, *Staphylococcus aureus*, вирусоподобные частицы, вторичная бактериальная пневмония, нейраминидаза вируса гриппа, резистентность к вторичной бактериальной пневмонии

## EXAMINING PROTECTIVE EFFICACY OF INFLUENZA VIRUS NA-CONTAINING VIRUS-LIKE PARTICLES (VLP) IN MOUSE MODEL OF POST-INFLUENZA BACTERIAL PNEUMONIA CAUSED BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Glubokova E.A., Leneva I.A., Falinskova I.N., Poddubikov A.V.

*I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Currently, pneumonia resulting from post-influenza infection still remains a pressing issue. In particular, virtually no studies regarding a role of immune response against influenza virus neuraminidase in regulating host susceptibility to subsequent bacterial superinfection are now available. Virus-like particles represent one of the new and promising approaches in contemporary virology for developing influenza vaccines and studying influenza virus proteins. Upon that, it is possible to obtain virus-like particles carrying individual influenza virus-derived proteins such as neuraminidase and hemagglutinin. This allows to get closer insight into potential role of individual influenza virus proteins for host immune response as well as assess a risk of developing secondary bacterial pneumonia. In this study we examined an immune response against influenza virus NA protein and its impact in generating resistance to secondary bacterial pneumonia by using neuraminidase-bearing virus-like particles. We used an experimental model of secondary bacterial pneumonia induced by *Staphylococcus aureus* after influenza infection. Animals were preliminarily vaccinated with virus-like particles carrying neuraminidase, hemagglutinin, or both (a cocktail of virus-like particles). In this model vaccinated animals were infected 21 days later with influenza viruses A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) and reassortant strain NIBRG-121xp (A/California/04/2009 (pndm H1N1 2009) X A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) bearing surface proteins hemagglutinin and neuraminidase derived from the A/California/04/2009 virus as well as the internal proteins derived from A/Puerto Rico/8/34. Next, 5 days after influenza infection mice were infected with *Staphylococcus aureus*. Moreover, animals in one group were simultaneously vaccinated and infected with A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) followed by inoculation on day 21 with reassortant virus NIBRG-121xp. The protective vaccine activity was assessed by measuring survival rate, life expectancy and decreased body weight loss. The data obtained showed that virus-like particles containing neuraminidase revealed no protective activity. However, a cocktail of virus-like particles, containing hemagglutinin and neuraminidase, protected animals from lethal outcome as well as body weight loss. Moreover, the increase virus-like particles containing neuraminidase in the cocktail of virus-like particles (virus-like particles containing neuraminidase + hemagglutinin) led to elevated protective effect after vaccination that was comparable or even superior to that one in mice with post-infectious immunity.

*Keywords:* influenza virus, *Staphylococcus aureus*, VLP vaccine, Secondary bacterial infection, influenza virus neuraminidase, resistance to secondary bacterial pneumonia

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-45-05002 «Вирусоподобные частицы для борьбы с постгриппозными бактериальными инфекциями», 2018-2020 гг.)

## Введение

Большая часть смертельных исходов от гриппа обусловлена вторичными бактериальными осложнениями, среди которых ведущую роль

занимают пневмонии. Противогриппозный иммунитет может определять не только чувствительность организма к вирусу гриппа, но и вероятность развития бактериальной суперинфекции, при этом некоторые белки вируса гриппа оказались вовлеченными в летальный синергизм вирус-бактериальных осложнений. Показано, что нейраминидаза вируса гриппа (NA) способствует бактериальной адсорбции на клетки эпителия, путем модификации клеточных поверхностей и увеличения экспрессии рецепторов адгезии. Однако исследования роли иммунного ответа к NA в регуляции восприимчивости организма к бактериальной суперинфекции после гриппозной инфекции практически отсутствуют. Одним из перспективных подходов, используемых в современной вирусологии, являются вирусоподобные частицы (ВПЧ), используемые, в частности, как платформа для разработки противогриппозных вакцин, при этом возможно получение ВПЧ, несущих отдельные белки вируса гриппа. Ранее нами была разработана мышинная модель вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа и *Staphylococcus aureus*, в которой был выявлен летальный синергизм между патогенами, отмечаемый в эпидемиологических наблюдениях.

**Целью нашей работы** являлось изучение иммунного ответа к белку вируса гриппа NA в формировании резистентности к вторичной бактериальной пневмонии с использованием ВПЧ, несущих NA. Для этих целей нами была использована экспериментальная модель вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *Staphylococcus aureus*, после гриппозной инфекции. Кроме того, вирусное заражение проводилось вирусом гриппа, отличным по антигенным свойствам от вируса, входящего в состав ВПЧ, что имитировало ситуацию несовпадения циркулирующих штаммов с вакцинными, имеющее место в природе.

## Материалы и методы

### Вирусы, бактериальные штаммы, культуры клеток

В опытах использовали клетки MDCK (Madin Darby canine kidney) – перевиваемая культура клеток почки собаки), полученные из коллекции ГУ НИИ вирусологии им. Ивановского.

Для моделирования гриппозной инфекции был использован штаммы вируса гриппа А/Пуэрто Рико/8/34 и реассортантом А/Пуэрто Рико/8/34 и А/Калифорния/04/2009 NIBRG-121хр (содержит 2 гена А/Калифорния/04/2009 и

6 генов А/Пуэрто Рико /8/34), полученные из музея ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Культура штамма *S. aureus* № 884 из коллекции лаборатории условно патогенных микроорганизмов ФГНБУ НИИВС им. И.И. Мечникова хранилась в лиофилизированном состоянии. Для получения живой культуры ампулу в стерильных условиях вскрывали и добавляли 0,5 мл питательного бульона (ГРМ-БУЛЬОН) (ФБУН ГНЦ ПМБ) и сердечно-мозговой бульон (Mast Group Ltd, Великобритания). Суспензию переносили в пробирку объемом 2 мл и инкубировали 4 ч при температуре 37 °С. Затем осуществляли посев на скошенный питательный агар (ГРМ-агар) (ФБУН ГНЦ ПМБ) с добавлением 5% лошадиной крови (ЗАО «ЭКОлаб»). Пробирки с культурой инкубировали в течение 18 ч при температуре 37 °С, по стандарту мутности определяли содержание бактерий в 1 мл объема и в этот же день использовали для заражения животных.

Вирусоподобные частицы (ВПЧ) были предоставлены руководителем австрийской стороны Miriam Klausberger (Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna).

### Животные

Мышей BALB/с, самок весом 20-22 г получали из питомника «Андреевка» (Московская обл.) и содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария. Содержание и кормление животных соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Содержание животных и манипуляции с ними соответствовали Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приказ Минздрава России от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации»).

### Изучение ВПЧ на модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии

Мышей (BALB/С, самки массой 20-22 г) на 21-й день после вакцинации инфицировали интраназально под легким наркозом вирусами гриппа А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1) и реассортантом NIBRG-121хр в дозах 0,3 МЛД50 (мышинная летальная доза).

Далее, на 5-й день после вирусного заражения мышей инфицировали в дозе  $2 \times 10$  КОЕ/мл (интраназально в объеме 0,05 мл). Протективную активность оценивали по уменьшению снижения веса, выживаемости и продолжительности жизни.

В качестве контрольных групп были использованы животные, инфицированные последовательно вирусом гриппа и *S. aureus*, вакцинируемые ФСБ.

Кроме того, одна группа животных одновременно с вакцинацией была инфицирована содержащей вирус гриппа А/Пуэрто Рико/8/34 аллантоисной жидкостью интраназально под легким наркозом в сублетальной дозе (0,03 мл, 0,5 МЛД<sub>50</sub>/мл). На 21-й день после первичного заражения животных заражали повторно гетерологичным реассортантом NIBRG-121xp(А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009)Х А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1) (2:6), содержащий поверхностные белки NA и NA от вируса А/Калифорния/04/2009, а внутренние белки от А/Пуэрто Рико/8/34.

## Результаты

В группах невакцинированных животных, инфицированных соответствующими вирусами А/Пуэрто Рико/8/34 и NIBRG-121xp, а также *S. aureus*, наблюдалась полная гибель животных при большой потере веса. При вакцинации контрольными Gag ВПЧ, не содержащими вирусных белков, смертность незначительно отличалась от таковой в соответствующих группах невакцинированных животных и составляла 90 и 80%.

При вакцинации ВЧП, содержащими только NA А/Пуэрто Рико/8/34 (NA – Gag ВПЧ), при последующем заражении гетерологичным вирусом NIBRG-121xp и бактериальным патогеном

наблюдалась полная гибель животных с большой потерей веса. У животных с постинфекционным иммунитетом в результате перенесенной инфекции вирулентным штаммом А/Пуэрто Рико/8/34 при повторном заражении гетерологическим вирусом наблюдалось снижение потери массы тела и выживаемость составила 60%. Несмотря на заражение гетерологическим вирусом, вакцинация ВЧП, содержащими только NA А/Пуэрто Рико/8/34 (NA – Gag ВПЧ), защищала 40% животных от гибели, снижало потерю их веса при последующем заражении *S. aureus*. Коктейль ВПЧ с низким содержанием NA (NA + NA – Gag ВПЧ 0,8 нг) защищал 30% животных и снижал потерю массы тела. Увеличение содержания частиц с NA в коктейле приводило к увеличению выживаемости. Так, при среднем содержании частиц с NA (NA + NA – Gag ВПЧ 4нг) защита от смертности составила 40%, а при высоком содержании частиц с NA (NA + NA – Gag ВПЧ 20нг) защита от смертности составила 60%, при этом наблюдалось снижение потери веса животных и размножения патогенов в их легких (рис. 1). Данные показатели в группе с высоким содержанием частиц NA превышали таковые у всех групп животных, инфицированных гетерологичным вирусом, с последующей бактериальной инфекцией *S. aureus*. В группе, зараженной только вирусом гриппа и вакцинированной коктейлем с высоким содержанием частиц NA (NA + NA – Gag ВПЧ 20 нг), также наблюдалось значительное сниже-

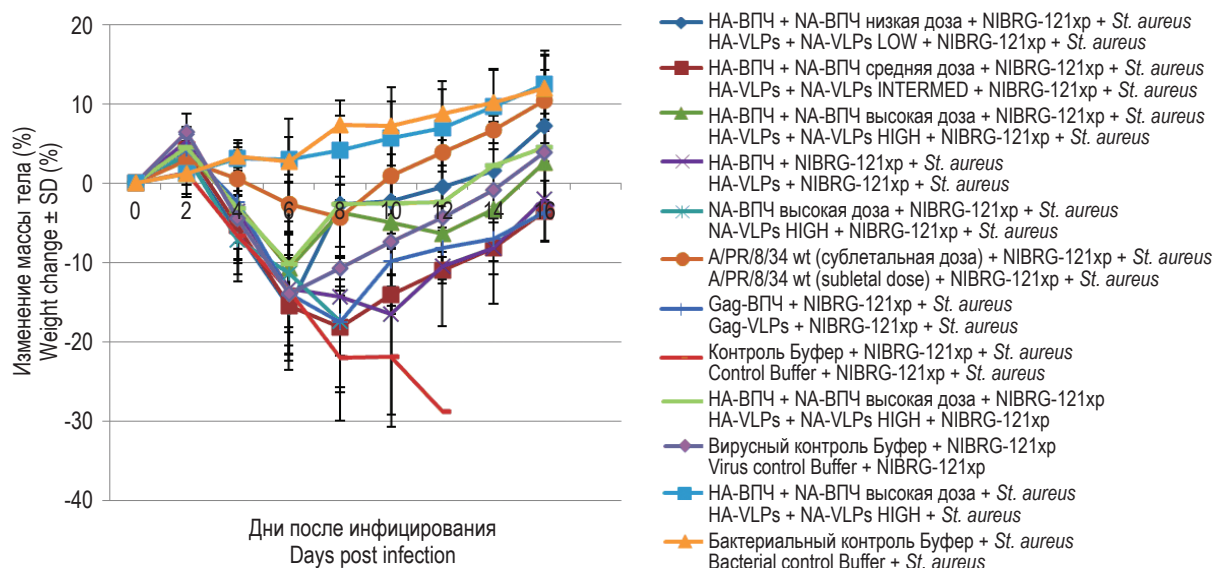


Рисунок 1. Изменение массы тела при заражении NIBRG-121xp + *S. aureus*

Figure 1. Change in body weight after infection with NIBRG-121xp + *S. aureus*



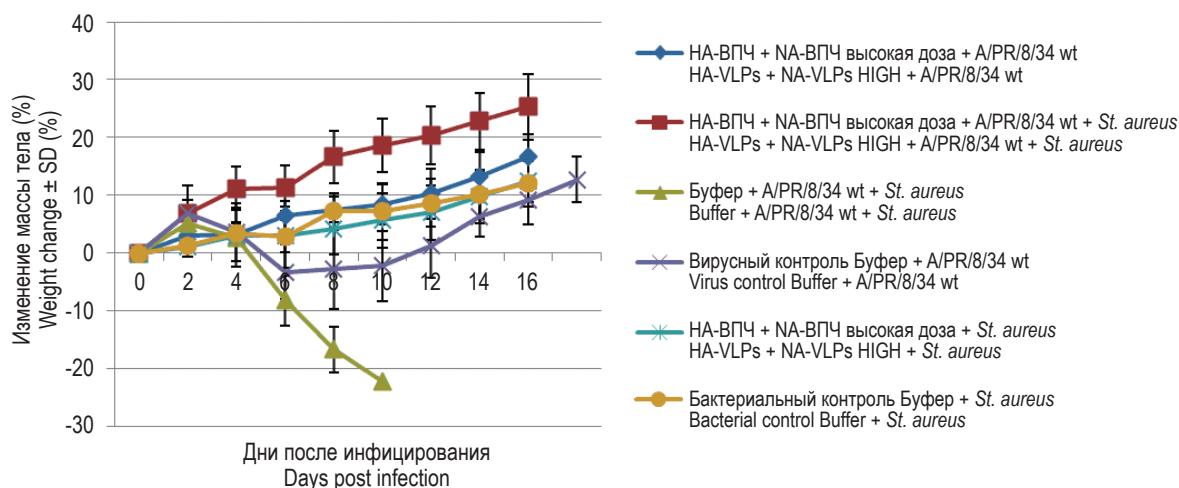


Рисунок 2. Изменение массы тела при заражении А/Пуэрто Рико/8/34 (A/PR/8/34) + *S. aureus*

Figure 2. Change in body weight after infection with A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34) + *S. aureus*

нии потери массы тела, а выживаемость составила 85%.

Вакцинирование этим же коктейлем ВЧП с высоким содержанием частиц NA полностью предотвращало гибель мышей, потерю их массы тела и снижало размножение вируса в легких при контрольном заражении гомологичным вирусом А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1) и последующей суперинфекцией бактериальным патогеном *S. aureus* (рис. 2).

## Заключение

Совокупность полученных результатов позволяет заключить, что иммунный ответ только к NA не обладал превалирующим значением при защите от вторичной бактериальной суперинфекции, спровоцированной инфекцией гетерологичным, по отношению к вакцинному препарату, штаммом вируса гриппа и не обеспечивал снижение летальности у животных. Можно предполо-

жить, что данный белок в отдельности не играет значительной роли для иммунного ответа и обеспечения протективного эффекта. Однако добавление NA в состав экспериментальной вакцины в максимальной дозе способствовало снижению летальности при гетерологичном вирусном заражении. Протективный эффект, достигаемый при иммунизации мышей коктейлем ВЧП, был сравним или превосходил таковой у мышей с постинфекционным иммунитетом в результате перенесенной инфекции вирулентным штаммом А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1).

Это позволяет предположить, что NA в отдельности не проявляют сильных протективных свойств. Однако в составе коктейля ВЧП, содержащим также NA, частицы с NA более действенны и обеспечивают защиту в мышинной модели постгриппозной бактериальной пневмонии, вызванной *Staphylococcus aureus*. При этом повышение содержания частиц с NA способствовало повышению протективного эффекта вакцинации.

## Список литературы / References

1. Глубокова Е.А., Вартанова Н.О., Поддубиков А.В., Ленева И.А. Индукция вторичной бактериальной пневмонии у мышей, вызываемой различными штаммами *Staphylococcus aureus* при заражении пандемическим и лабораторным штаммами вируса гриппа H1N1 // Вестник «Биомедицина и социология», 2018. Т. 3, № 3. С. 12-14. [Glubokova E.A., Vartanova N.O., Poddubikov A.V., Leneva I.A. Induction of secondary bacterial pneumonia in mice caused by different strains of *S. aureus* infected with pandemic and laboratory strains of the H1N1 influenza virus. *Vestnik "Biomeditsina i sotsiologiya" = Bulletin "Biomedicine and Sociology"*, 2018, Vol. 3, no. 3, pp. 12-14. (In Russ.)]
2. Ленева И.А., Егоров А.Ю., Фалынскова И.Н., Махмудова Н.Р., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Вартанова Н.О., Поддубиков А. Индукция вторичной бактериальной пневмонии у мышей при заражении пандемическим и лабораторным штаммами вируса гриппа H1N1 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019. № 1. С. 68-74. [Leneva I.A., Egorov A.Yu., Falynskova I.N., Makhmudova N.R., Kartashova N.P., Glubokova E.A., Vartanova N.O., Poddubikov A. Induction of secondary bacterial pneumonia in mice at infection with pandemic and laboratory strains of influenza H1N1 virus // *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019. No. 1. P. 68-74.]

Kartashova N., Glubokova E.A., Vartanova N.O., Poddubikov A.V. Induction of secondary bacterial pneumonia in mice upon infection with pandemic and laboratory strains of the H1N1 influenza virus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 1, pp. 68-74. (In Russ.)]

3. Egorov A. The problem of bacterial complications post respiratory viral infections. *MIR J.*, 2018, Vol. 5, no. 1, pp. 12-21.

---

**Авторы:**

**Глубокова Е.А.** — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии отдела вирусологии имени О.Г. Анджаридзе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Москва, Россия

**Ленева И.А.** — д.б.н., заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии отдела вирусологии имени О.Г. Анджаридзе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Москва, Россия

**Фалынская И.Н.** — научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии отдела вирусологии имени О.Г. Анджаридзе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Москва, Россия

**Поддубиков А.В.** — к.б.н., заведующий лабораторией микробиологии условно патогенных бактерий отдела микробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Москва, Россия

**Authors:**

**Glubokova E.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, O.G. Anjaparidze Department of Virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Leneva I.A.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Virology, O.G. Anjaparidze Department of Virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Falynskova I.N.**, Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, O.G. Anjaparidze Department of Virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Poddubikov A.V.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Microbiology of Opportunistic Bacteria, Department of Microbiology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 04.08.2020  
Принята к печати 02.09.2020

Received 04.08.2020  
Accepted 02.09.2020