

УДК 616.921.5:615.371:616.211:616.98-053.2

**Сусанна Esposito<sup>1</sup>, Паола Marchisio<sup>1</sup>, Элизабетта Prada<sup>1</sup>,  
Кристина Daleno<sup>1</sup>, Лаура Porretti<sup>2</sup>, Рита Carsetti<sup>3</sup>, Анна-Лиза Bosco<sup>1</sup>,  
Валентина Ierardi, Алессия Scala<sup>1</sup>, Никола Principia<sup>1</sup>**

## **Влияние смешанного бактериального лизата (ОМ-85 BV) на иммуногенность, безопасность и переносимость инактивированной вакцины против гриппа у детей с рецидивирующей инфекцией дыхательных путей\***

<sup>1</sup>Отделение детской интенсивной терапии, кафедра патофизиологии и трансплантологии Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca 'Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Милан, Италия

<sup>2</sup>Отделение цитометрии, Департамент регенеративной медицины,

Фонд IRCCS Ca 'Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Милан, Италия

<sup>3</sup>Отделение лабораторий, детской больницы Bambino Gesù IRCCS, Рим, Италия

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA.2015.5(69):36-43

*Известно, что иммуногенность и эффективность стандартных инактивированных вакцин против гриппа (ПВ) не имеет должного результата у детей. Целью данного проспективного рандомизированного простого слепого исследования было сравнить иммунный ответ на эффективность и безопасность вакцины ПВ (Fluarix, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium). В исследовании принимали участие 68 детей с рецидивирующей респираторной инфекцией (-РРИ), средний возраст которых составлял 36–59 месяцев. Детям была назначена вакцина в комбинации с (n=33) или без (n=35) бактериального лизата ОМ-85 BV (Broncho-vaxom, Vifor Pharma, Geneva, Switzerland). ОМ-85 BV не оказала никакого влияния на показатели сероконверсии или серопротекции, среднее геометрическое значение титров или дендритные клетки, данные которых не особо отличались между двумя группами. Более того, применение вакцины ОМ-85 BV незначительно увеличило пул В-клеток памяти, которые производят антитела IgG и IgM против антигенов гриппа. У детей, получавших ОМ-85 BV (p<0,05), была значительно ниже частота РРИ, что подтверждает ее эффективность. Разницы в частоте побочных эффектов между двумя группами не обнаружено. Это доказывает, что иммунная реакция детей на введение вакцины ОМ-85 BV против гриппа не ярко выражена. Хотя можно отметить, что использование ОМ-85 BV ранее и в комбинации с ПВ уменьшает количество случаев заболеваемости респираторными инфекциями, а также является безопасным методом вакцинации.*

**Ключевые слова:** бактериальный лизат, дети, грипп, вакцина против гриппа, ОМ-85BV, рецидивирующая респираторная инфекция.

### **1. Введение**

Рецидивирующие респираторные инфекции (РРИ) являются очень распространенной патологией у детей первых лет жизни, в основном из-за незрелости их иммунной системы и наличия факторов окружающей среды, которые увеличивают риск воздействия патогенов [1]. Несмотря на слабо выраженное течение болезни, РРИ имеют нежелательные медицинские, семейное и социально-экономические последствия. В связи с этим были разработаны различные превентивные стратегии, в том числе и назначение иммуностимуляторов и вакцин, с целью уменьшить частоту возникновения РРИ [2–5].

Наиболее широко исследован иммуностимулятор ОМ-85 BV – бактериальный лизат из восьми бактерий, который включает самые распространенные респираторные патогены (*Haemophilus influenzae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Moraxella catarrhalis*). Препарат оказывает положительное воздействие на врожденный иммунитет путем увеличения активности макрофагов и нейтрофилов и продукции цитокинов, а также на приобретенный иммунный ответ, регулируемый лимфоцитами и синтезом антител [6–8]. Кроме того, клинические исследования показали, что он безопасен, хорошо переносится и в отдельных случаях достаточно эффективен в снижении

частоты респираторных заболеваний у детей и взрослых с РРИ в анамнезе [9].

Вакцина против гриппа назначалась пациентам с хроническими респираторными инфекциями. Установлено, что применение вирусомального адьювантного препарата эффективно снижает количество случаев заболеваемости гриппом и респираторными инфекциями у детей с РРИ [5]. К сожалению, иммуногенность и эффективность традиционной инактивированной вакцины против гриппа (ПВ) недостаточна у детей младшего возраста [10], а более эффективные препараты, такие как живые аттенуированные или инактивированные адьювантные вакцины против гриппа, либо не продаются, либо не имеют лицензии для использования в педиатрии в Европе [11–16].

Поскольку наибольшее количество эпизодов заболеваемости РРИ приходится на зимний период, повторный курс вакцинации ОМ-85 BV необходим для получения наилучших результатов и, как правило, назначается с начала осени [2,4,9], в то время как вакцины против гриппа назначают через несколько недель [11]. Поэтому высока вероятность того, что иммунная стимуляция, индуцированная с помощью ОМ-85 BV, может усилить реакцию антител гриппа с ПВ.

**Целью** данного исследования было изучение возможного влияния ОМ-85 BV на иммуногенность ПВ путем сравнения гуморального и клеточного ответов к ПВ

\* Перевод. Оригинал статьи: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.055>

История статьи: получена 13 января 2014, поступила в переработанном виде 25 февраля 2014, принята 13 марта 2014.  
Доступно онлайн 26 марта 2014

у детей, получающих дополнительно OM-85 BV либо без него, а также безопасность и переносимость самой вакцины.

## 2. Пациенты и методы

### 2.1. Дизайн исследования и популяция

Это проспективное рандомизированное простое слепое исследование было проведено в Италии, в одном из университетов города Милан, в отделении детской интенсивной терапии, кафедры патофизиологии и трансплантологии. Период проведения исследования: с 1 октября 2012 года по 31 марта 2013 года. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом Fondazione IRCCS Ca 'Granda Ospedale Maggiore Policlinico. Исследование было проведено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики с целью изучения лекарственных средств в организме человека. Письменное информированное согласие было получено от родителей или законных опекунов каждого ребенка, который принимал участие в исследовании.

Исследование включало сравнение иммуногенности и безопасности стандартной внутримышечной (в.м.) дозы трехвалентного расщепленного вируса вакцины от гриппа (*Fluarix, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium*). Вакцина вводилась детям в возрасте 36–59 месяцев с рецидивирующей инфекцией дыхательных путей в анамнезе (определяется как  $\geq 6$  количество эпизодов респираторной инфекции в течение предыдущих 12 месяцев) [1], которые ранее хотя бы однократно проходили вакцинацию против гриппа.

Дети были отобраны на основе компьютерного списка рандомизации из числа тех, кто поступил в клинику для больных респираторными инфекциями с подтвержденным диагнозом рецидивирующей инфекции дыхательных путей в истории болезни. В период с 1 по 15 октября 2013 года пациенты были разделены на две группы 1:1. Первая группа испытуемых прошла вакцинацию с OM-85 BV (*Broncho-vaxom, Vifor Pharma, Geneva, Switzerland*), вторая группа в данной вакцинации участие не принимала.

Администрированные данные о пациентах не были включены в клиническое исследование (VI), и после рандомизации дети были повторно осмотрены педиатрами слепым методом для дальнейшего распределения в группы лечения. Пациентов и их родителей предупредили о неразглашении ранее проведенной вакцинации педиатрам, которые проводили дальнейшее исследование. Из исследования были исключены дети с наличием таких серьезных заболеваний, как хронические легочные заболевания, включая астму, с признаками сердечной или почечной недостаточности, острым недоеданием, прогрессирующей неврологической болезнью, с синдромом Дауна или другими известными цитогенетическими расстройствами, а также пациенты с подтвержденным диагнозом или подозрением на болезнь иммунной системы. Также из исследования были исключены дети, ранее получавшие иммуносупрессивную терапию, в том числе системные кортикостероиды, в виде преднизолона в эквивалентной дозе 2 мг/кг/день (или в общей сложности 20 мг в день для детей с массой тела более 10 кг) в течение более чем 14 дней, и дети, у которых в истории болезни отмечена гиперчувствительность на яйца, яичный белок или любой другой компонент вакцины.

Пациентам, которым была назначена вакцина OM-85 BV, нужно было принимать капсулу для перорального приема, содержащую 3,5 мг стандартизированные лиофилизированные фракции восьми наиболее распространенных респираторных бактерий (*H. influenzae, D. pneumoniae, K. pneumoniae, K. ozaenae, S. aureus, S. pyogenes, S. viridans, M. catarrhalis*), с периодичностью один раз в день на протяжении 10 дней в течение трех месяцев.

Дети обеих групп были вакцинированы (с 15 октября по 15 ноября 2013 г.) с помощью инъекции в дельтовидную область левого плеча. Дети, которым была назначена OM-85 BV, были вакцинированы 15-го  $\pm 2$  дня после окончания 10-дневного курса.

Для оценки иммуногенности образцы сыворотки крови были собраны перед введением первой дозы, в 1-й день вакцинации (базовый) и 28-й  $\pm 3$  дня (четыре недели после вакцинации и через две недели после второй вакцинации OM-85 BV), а также на 90-й день  $\pm 3$  (через три месяца после вакцинации и через шесть недель после третьей вакцинации OM-85 BV).

Безопасность оценивалась путем сбора данных о каких-либо местных и системных реакциях (от исследователей, проводивших данную научную работу в начале и во время последующих осмотров, и от родителей/опекунов детей в течение 14 дней после вакцинации с использованием регистрационного журнала). Дети были исследованы и опрошены на предмет возникновения неблагоприятных явлений (НЯ) — местных (эритема, отек/уплотнение и боли) и системных (температура тела  $\geq 38^\circ\text{C}$ , ринит, раздражительность, сонливость, смена привычек питания, рвота и диарея).

Семье каждого ребенка был предложен заранее подготовленный регистрационный журнал, с помощью которого определялся тип и количество инфекции верхних дыхательных путей (ИВДП) — острый фарингит, острый средний отит, круп; инфекции нижних дыхательных путей (ИНДП) — острый бронхит, одышка, воспаление легких. Также в журнал вносилась информация о назначении курсов антибиотиков и освобождения от школьных занятий в течение всего периода исследования.

### 2.2. Оценка гуморального иммунного ответа

Титры антител гемагглютинации ингибирования (ГИ) против всех трех штаммов гриппа, входившие в состав вакцины гриппа в 2012–2013 гг., были обнаружены у всех детей, которым был сделан соответствующий забор крови на 1-й, 28-й  $\pm 3$  и 90-й  $\pm 3$  день исследования, как описано выше. Результаты отображены в виде обратной величины наивысшего разведения ингибирующей агглютинации [17,18]. Чтобы рассчитать среднее геометрическое значение титров (СГТ), титр 1:5 был произвольно задан пациентам с отсутствием клинического ответа, как описано ранее [19]. Иммуногенность конечных точек была основана на запатентованных критериях торможения гемагглютинации, установленных под руководством Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕАЛС) [20]. Поскольку в ЕАЛС для детей не существует ни одного определяющего критерия, иммуногенность оценивали с использованием критериев для взрослых людей в возрасте 18–60 лет, которые требуют, по крайней мере, одного из следующих действий для каждого штамма [21]: 1) сероконверсии,  $\geq 4$  раза увеличение титра антител ГИ с титром  $\geq 1:40$  существенно достигший в  $>40\%$  случаев; 2) серопротекции, титр антител ГИ  $\geq 1:40$  у  $>70\%$  пациентов; 3) по СГТ:  $>2,5$ -кратное увеличение в СГТ антител гемагглютинации ингибирования.

### 2.3. Оценка клеточного иммунитета

#### 2.3.1. Оценка периферических дендритных клеток

Периферическая кровь была собрана в гепарин натрия, постепенно обрабатываясь в течение 24 часов. Дендритные клетки (ДК) и плазмоцитойдные дендритные клетки (ПДК) оценивали в 1-й, 28-й  $\pm 3$  и 90-й  $\pm 3$  день [22], с последующим окрашиванием 100 мл крови в моноклональные антитела: коктейль первичных антител конъюгированных ФИТЦ (в

том числе соединения анти-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20 и -CD56), PE- конъюгированных анти-CD123, PerCP-конъюгированных анти-HLA-DR и Alexa Fluor® 647-конъюгированными анти-CCR7 (*Becton Dickinson Biosciences, BD, San Diego, CA, USA*). Отрицательный контроль для каждого образца представлял собой смесь изотипов IgG, конъюгированных с теми же флуорохромами, которые использовались в положительном образце. После окрашивания эритроциты лизировали хлоридом аммония, а затем образцы были получены и проанализированы с помощью программного обеспечения FACSCantoII и FACSDiva.

### 2.3.2. Оценка гриппа конкретных клеток памяти в периферической крови

Частоту В-клеток памяти, продуцирующих антител IgM или IgG против антигенов, входивших в состав введенной вакцины, а также антиген вируса гриппа А/Техас/36/91 (H1N1) (NIBSC, UK), который не входил в состав вакцины, оценивали только в самом начале и на 28-й ±3 день исследования.

Гепаринизированные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) были выделены с помощью Ficoll Paque™ Plus (*Amersham Pharmacia Biotech, UK*) центрифугированием в градиенте плотности, подсчитаны и использованы для культивирования или окрашивания с соответствующей комбинацией флуоресцентных меченых антител с последующим цитометрическим анализом. Для поликлональной стимуляции В-клеток памяти 1–2x10<sup>6</sup> МКПК культивировали в течение 5 дней в RPMI 1640 (*Gibco BRL Life Technologies, Paisley, UK*) с добавлением 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (*FBS, Hyclone Laboratories, Logan, UT, США*), 2% L-глутамин (*Gibco BRL Life Technologies, Paisley, UK*), 5x10<sup>-5</sup> М 2-β-меркаптоэтанол (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, США*) 20 мг/мл гентамицина (*Gibco BRL Life Technologies, Paisley, UK*), 2,5 г/мл CpG-ODN (*Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands*), 20 мкДж/мл рекомбинантного ИЛ-21 (*Peprotech, Paisley, UK*), 20 нг/мл рекомбинантного ИЛ-4 (*Peprotech, UK*).

Десятишестиугольные планшеты (*MultiScreen-HA, Millipore, BV, Ireland*) были наполнены на всю ночь AffiniPure F (ab<sup>+</sup>) двумя фрагментами антител козы к человеческому Ig (H+L) (*Jackson Immuno Research Laboratories, Pennsylv-*

*vania, USA*). Полусерийные растворы были сделаны, начиная с первой лунки с 5x10<sup>4</sup> клеток для обнаружения общего IgM и IgG и 2,5x10<sup>5</sup> клеток для специфических антителопродуцирующих клеток. Для того, чтобы обнаружить антигенспецифические В-клетки памяти, планшеты покрывали комбинацией антигенов, которые входили в состав сезонных вакцин (А/California/7/2009 (H1N1), А/Victoria/361/2011 (H3N2), В/Wisconsin/1/2010) или антивакцинального А/Texas 36/91 (H1N1) антигена. После инкубации планшеты промывали с помощью dH<sub>2</sub>O/0,05% Tween 20 (один раз) и PBS/0,05% Tween 20 (два раза) и выращивали всю ночь с анти-IgMHRPO (1:1000) или анти-IgGHRPO (1:2000) (*Jackson Immuno Research Laboratories, штат Пенсильвания, США*), разбавленным в PBS +1% желатина +0,05% Tween20 (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*). После двухразового промывания готовый к использованию субстрат ТМВ от компании Mabtech-ELISpot, а также комплект инструментов для человеческого IgG (*Mabtech AB, Nackada Strand, Sweden*) были использованы в соответствии с инструкцией завода-изготовителя. Планшеты оставляли при комнатной температуре с целью развития голубизны, реакцию, в свою очередь, останавливали с помощью dH<sub>2</sub>O. Планшеты оставляли высыхать перед расчетами с помощью планшет-ридера ELISpot (*A.EL.VISA.EL.VIS, Gannover, Germany*).

Частоту антигенспецифических В-клеток памяти рассчитывали делением количества характерных точек по количеству общих точек IgM или IgG, которые измерялись с определенной периодичностью времени. Иммунологическая эффективность вакцины в состоянии увеличить количество характерных точек IgG; большинство антител IgM остались естественными, хотя некоторые из них также появились в ранние сроки после вакцинации в зародышевых центрах.

### 2.4. Статистический анализ

Учитывая достаточную иммуногенность у 60% субъектов, которые получали только ПИВ, и 90% у тех, кто получает ПИВ и ОМ-85 ВВ, приблизительно 31 пациент из каждой группы должен был показать превосходство использования ОМ-85 ВВ, с альфа 0,05 и мощностью 0,80. Учитывая процент отсева 15%, мы включили в исследование

Таблица 1

Демографические характеристики популяции исследования

Характеристика	Лечение с ОМ-85ВВ и вакцинация ПИВ (n=35)	Только вакцинация с ПИВ (n=35)
Мужской пол (%)	18 (51,4)	17 (48,6)
Средний возраст ± SD лет	4,36±1,76	3,97±1,88
Европейская раса (%)	34 (97,1)	33 (94,3)
Семейные связи	109	116
Вакцинированных против гриппа (%)	9/109 (8,3)	10/116 (8,6)
Среднее количество членов семьи	3,1	3,3
Родители	67	68
Братья и сестры	42	48
Работающие матери (%)	27/35 (77,1)	28/35 (80,0)
Работающие отцы (%)	32/32 (100,0)	33/33 (100,0)
Среднее число ИРТ в предыдущие 12 месяцев ± SD	8,31±2,11	8,03±1,97
Среднее количество курсов антибиотика в предыдущие 3 месяца ± SD	2,14±1,25	2,33±1,39
Грудное вскармливание ≥3 месяцев (%)	24 (68,6)	25 (71,4)
Городской житель (%)	34 (97,1)	33 (94,3)
Наличие хотя бы одного старшего брата или сестры (%)	15 (42,9)	16 (45,7)
Воздействие сигаретного дыма (%)	16 (45,7)	14 (40,0)
Дневной уход за ребенком* (%)	21 (60,0)	19 (54,3)
Госпитализация в предыдущие 3 месяца (%)	1 (2,9)	0 (0,0)
Исключение из исследования после первой вакцинации (%)	2/35 (5,7)	0 (0,0)

Примечания: 1. Статистически значимой разницы не обнаружено. 2. СГТ – инфекции дыхательных путей; ПИВ – инактивированная вакцина против гриппа; SD – стандартное отклонение. \* – 5–6 дней/неделю, 6–8 ч/день. 3. Анализ были двусторонними и значения <0,05 считались значимыми.

Таблица 2

**Гуморальные иммунные ответы на инактивированную вакцину против гриппа (ИВ)  
у детей, получавших OM-85 BV, и детей группы контроля**

Иммунный ответ	Вакцинация с OM-85BV и ИВ (n=35)	Использование только ИВ (n=35)
<b>A/H1N1</b>		
Сероконверсия, N (%)		
после 28±3 дней	23 (69,7)	24 (68,5)
после 90±3 дней	22 (66,6)	23 (65,7)
Серопротекция, N (%)		
после 28±3 дней	31 (93,9)	32 (91,4)
после 90±3 дней	28 (84,8)	29 (82,9)
СГТ, базовый	122,5	136,4
после 28±3 дней (кратное увеличение)	779,1 (6,3)	803,9 (5,9)
после 90±3 дней (кратное увеличение)	466,7 (3,8)	399,1 (2,9)
<b>A/H3N2</b>		
Сероконверсия, N (%)		
после 28±3 дней	22 (66,6)	23 (65,7)
после 90±3 дней	21 (63,6)	22 (62,8)
Серопротекция, N (%)		
после 28±3 дней	29 (87,9)	32 (91,4)
после 90±3 дней	27 (81,8)	30 (85,7)
СГТ (кратное увеличение)	96,8	116,9
после 28±3 дней	464,2 (4,8)	503,1 (4,3)
после 90±3 дня	333,4 (3,4)	370,0 (3,2)
<b>B</b>		
Сероконверсия, N (%)		
после 28±3 дней	23 (69,7)	26 (74,3)
после 90±3 дней	25 (75,7)	27 (77,1)
Серопротекция, N (%)		
после 28±3 дней	25 (75,7)	27 (77,1)
после 90±3 дней	27 (81,8)	28 (80,0)
СГТ (кратное увеличение)	24,8	43,1
после 28±3 дней	299,1 (12,1)	406,2 (9,4)
после 90±3 дня	344,0 (13,9)	541,6 (12,6)

Примечания: 1. Статистически значимой разницы не обнаружено. 2. СГТ – средний геометрический титр; ИВ – инактивированная вакцина против гриппа.

по 35 человек в каждую группу. Непрерывные переменные выражены в виде средних значений ± стандартное отклонение (SD) и проанализированы с помощью двухстороннего критерия Стьюдента, при условии нормального распределения (на основе критерия Шапиро–Уилка), или двустороннего критерия Уилкоксона, если это условие не соблюдалось. Категориальные переменные выражались в виде чисел и процентов, которые были проанализированы с помощью анализа непредвиденных таблиц, статистики χ-квадрата или критерия Фишера соответственно.

### 3. Результаты

#### 3.1. Популяция исследования

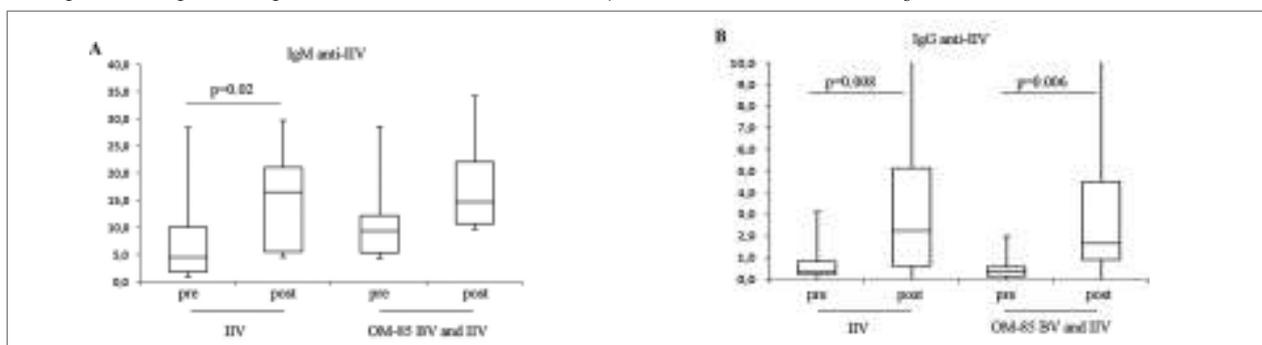
В исследовании принимали участие 70 детей (35 мальчиков, средний возраст которых составлял ±SD 4,1±1,1 года),

которые получали ИВ (по 35 детей в каждой группе). Демографические характеристики и исходные параметры детей обеих групп были одинаковыми (табл. 2). Родители двоих детей, которые в ходе исследования получали OM-85 BV, не дали свое согласие на забор крови, в результате чего эти данные не были включены в наше исследование. Следовательно, сравнение проводилось между детьми, которые получали OM-85 BV (33 ребенка), и которые получили только ИВ (35 детей).

#### 3.2. Гуморальный иммунный ответ

Таблица 2 демонстрирует гуморальные ответы на ИВ. Межгрупповое отличие в сероконверсии и серопротекции ставок или СГТ не обнаружено. Аналогичная картина наблюдалась на 28-й ±3 и 90-й ±3 день после вакцинации.

#### 3.3. Клеточный иммунитет



**Рис. 1.** Вакцинация с применением ИВ значительно увеличила пул клеток памяти, производящих IgG против антигенов, входящих в состав сезонной вакцины. А — коробчатая диаграмма отображает частоту IgM-специфических точек до и на 28-й день после вакцинации с использованием или без OM-85 BV бактериального лизата. Количество точек было выше в группе, которая не получала лизат. В — коробчатая диаграмма отображает частоту IgG-специфических точек, которая значительно увеличилась в обеих группах.

Таблица 3

**Заболеваемость респираторными инфекциями после введения инактивированной вакцины против гриппа (IV) у детей, получавших OM-85 BV, и детей группы контроля**

	Вакцинация с OM-85BV и IV (n=35)	Использование только IV (n=35)
Наличие хотя бы одного случая ИВДП (%)	20 (60,6)*	31 (88,6)
Среднее число ИВДП ± SD	0,73 ± 0,49*	2,19 ± 0,73
Наличие хотя бы одного случая ИНДП (%)	5 (15,2)*	15 (42,9)
Среднее число ИНДП ± SD	0,28 ± 0,16	0,68 ± 0,44
Количество заболеваемости гриппом (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
Наличие хотя бы одной госпитализации (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
Среднее количество курсов антибиотиков, назначенных в связи с ИВДП или ИНДП ± SD	0,49 ± 1,06*	1,76 ± 0,63
Среднее число пропусков в школе ± SD	3,16 ± 2,10*	6,55 ± 2,34

Примечания: 1.\* p<0,05 – отсутствие каких-либо существенных различий по сравнению с группой контроля. 2. ИНДП – инфекции нижних дыхательных путей, SD – стандартное отклонение, ИВДП – инфекции верхних дыхательных путей.

Таблица 4

**Основные местные и системные реакции в течении 14 дней после вакцинации инактивированной вакциной против гриппа (IV) у детей, получавших OM-85 BV, и детей группы контроля**

Побочный эффект	Вакцинация с OM-85BV и IV (n=35)	Только с IV (n=35)
Местные реакции, N (%)		
Эритема	1 (3,0)	1 (2,9)
Отек/уплотнение	3 (9,0)	5 (14,2)
Боль	1 (3,0)	1 (2,9)
Хотя бы одна местная реакция	4 (12,1)	6 (17,1)
Системные реакции, N (%)		
Лихорадка ≥38°C	1(3,0)	2 (5,7)
Раздражительность	2 (6,0)	3 (8,6)
Сонливость	1 (3,0)	1 (2,9)
Рвота	0 (0,0)	1 (2,9)
Диарея	1 (10,0)	0 (0,0)
Хотя бы одна системная реакция	2 (6,0)	4 (11,4)
Хотя бы одна местная или системная реакция	5 (15,2)	7 (20,0)
Реакция, требующая применения препаратов для местной или системной реакции	4 (12,1)	5 (14,2)
Серьезные побочные эффекты	0 (0,0)	0 (0,0)

Примечание. Статистически значимого отличия не обнаружено.

Никакого существенного различия между группами в общем количестве ДК или присутствии плазмацитоидных ДК не отмечалось.

Изменения частоты В-клеток памяти, продуцирующих IgG, специфичных для антигенов гриппа, входящих в состав вакцины, показаны на рис. 1: рост у детей, получавших OM-85 BV (p=0,006), и не получавших в группе контроля (p=0,008), без особой разницы между группами. В то время как количество В-клеток памяти, секретирующих антитела IgM против антигенов IV, значительно увеличилось только в группе, которая не получала бактериальный лизат. Количество В-клеток памяти, продуцирующих IgG и IgM против антигена вируса гриппа A/Техас/36/91, также было больше после вакцинации, но разница между группами не была статистически значимой, что отражает специфичность реакции в обеих группах (рис. 2).

**3.4. Рецидивы респираторных инфекций**

Заболеваемость респираторными инфекциями после IV показана в табл. 3. Количество детей, у которых отмечался хотя бы один эпизод ИВДП, среднее число эпизодов ИВДП, число детей, у которых отмечался хотя бы один эпизод ИНДП, среднее число эпизодов ИНДП, среднее число курсов антибиотиков и среднее число пропусков в школе были значительно ниже у детей, получавших OM-85 BV (p<0,05).

**3.5. Безопасность**

Нежелательные явления, наблюдавшиеся в ходе исследования, показаны в табл. 4. Местные реакции были отмечены у четырех детей, получавших OM-85 BV (12,1%), и шести детей в группе контроля (17,1%). Все события были зафиксированы в течение первых двух дней после введения вакцины, а симптомы длились не

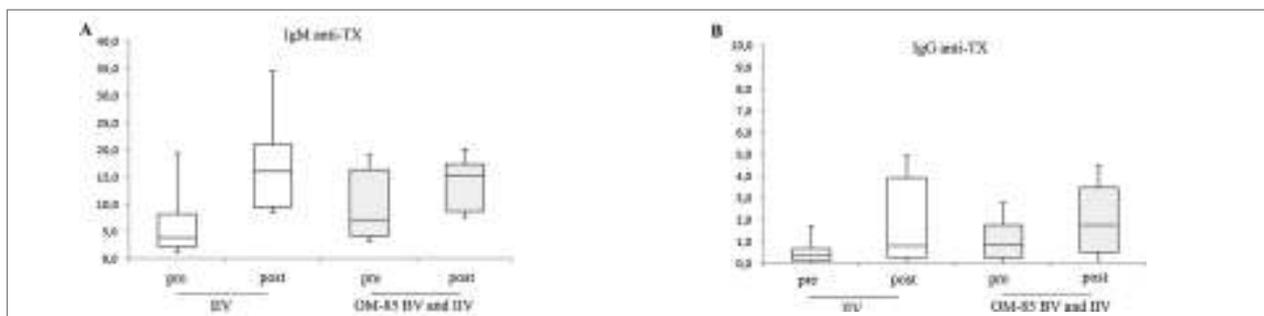


Рис. 2. Вакцинация вызывает незначительное увеличение В-клеток памяти, которые секретируют антитела против вируса гриппа, не содержащиеся в сезонной вакцине: А) Участок частоты IgM-специфичных пятен. (В) Участок частоты IgG-специфичных пятен.

более двух дней. Системные реакции наблюдались у двоих детей, получавших ОМ-85 ВВ (6,0%), и четверых (11,4%) в группе контроля. Все события были задокументированы в течение первых пяти дней после введения вакцины, а симптомы длились не более трех дней. Каких-либо серьезных НЯ в течение всего периода исследования не наблюдалось.

Это исследование доказывает, что введение ОМ-85 ВВ в течение 10 дней на протяжении трех месяцев, начиная с октября, может сыграть значительную роль в снижении возникновения новых эпизодов респираторных инфекций у детей, у которых в зимний период в истории болезни отмечались частые респираторные инфекции. Данное исследование подтверждает результаты ранее проведенного исследования, в котором отмечалось значительное снижение ИВДП и ИНДП на фоне снижения использования антибиотиков и количества пропусков в школе по причине болезни у детей с частыми респираторными инфекциями, которые получали ОМ-85 ВВ [23–27].

В отличие от детей, которые прошли вакцинацию только с ПИВ, дети, получившие ОМ-85 ВВ и ПИВ, были менее подвержены клиническим и социально-экономическим проблемам, которые зачастую связаны с респираторными инфекциями. Поскольку исследование не включало контрольную группу детей, в которой исключался прием ПИВ и ОМ-85 ВВ, положительный клинический эффект от приема вакцин у детей достоверно не установлен. Также не отмечен факт того, что положительный результат связан исключительно с приемом вакцины ОМ-85 ВВ, или же того, что вакцина ПИВ оказывает такое же влияние. Кроме того, циркуляция вирусов гриппа была относительно низкой в зимний период 2012–2013 гг., и, учитывая относительно небольшое число обучающихся детей, вполне возможно, что положительный эффект от вакцинации не был обнаружен.

Назначение ОМ-85 ВВ и ПИВ в течение короткого промежутка времени безопасно и хорошо переносится, что дает возможность их одновременного использования. Хотя листок-вкладыш с инструкцией по использованию лизата (который недавно был пересмотрен в некоторых странах) предполагает введение вакцины только после ОМ-85 ВВ и ее отмену, как минимум, в течение четырех недель после [9].

Результаты этого исследования показывают, что введение ПИВ в течение 15 дней после первого курса ОМ-85 ВВ не влияет на гуморальный иммунный ответ на вакцину и не активизирует ДК в крови. Эти результаты отличаются от полученных на мышинной модели, в которой другие авторы обнаружили повышенную иммуногенность вследствие вакцинации от гриппа путем совместного введения иммуностимуляторов [28,29]. Эти различия в росте гуморального иммунного ответа на антигены гриппа, вызванного иммуностимуляторами, объясняются количеством дозы введения, которая в нашем исследовании, вероятно, была ниже по сравнению с мышинной, а также пероральной иммуностимуляцией, которая могла быть слабее по сравнению с сублингвальным введением. Данные не совпадают с выводами *Zelle Rieser u соавт.*, которые изучал *in vitro* влияние ОМ-85 ВВ на моноцитарные ДК и определили, что она может быть использована для стимуляции созревания ДК [30]. Тем не менее, отрицательные результаты были получены *Spisek и соавт.*, которые сравнивали *in vitro* влияние различных иммуностимуляторов и обнаружили, что ОМ-85 ВВ не меняет характеристики ДК [31]. Различия между этими исследованиями ДК может объяснить разнице в дозе ОМ-85 ВВ, которая была в два раза выше в первой экспериментальной работе [31]. Также

возможно, что отрицательные результаты исследования по оценке влияния ОМ-85 ВВ на ДК в естественных условиях были связаны с периодом введения. Кроме того, учитывая, что клеточный ответ варьирует в широких пределах, количества исследуемых в исследуемой популяции может быть недостаточно, чтобы достичь статистической значимости. Также в последних неклинических исследованиях с ранее подверженными экспериментам большими мышами установлено, что стимуляция ДК в бронхоальвеолярном лаваже может значительно отличаться [3]. Ввиду миграции ДК от GALT к MALT, измерения в легких может быть полезным при изучении эффекта от ОМ-85 на клеточном уровне, стоит отметить, что он не рекомендуется к применению для здоровых пациентов раннего возраста.

В ходе исследования подтвердилось, что введение ПИВ сопровождается значительным увеличением частоты IgG и IgM В-клеток памяти на фоне антигенов, входящих в состав вакцины, хотя статистически значимых различий в частоте специфических клеток памяти между двумя группами не обнаружено. ОМ-85 ВВ не влияет на форму специфического ответа IgG. IgM-секретирующие В-клетки памяти относятся к двум группам: одни производят естественные антитела, другие возникают на ранних этапах иммунного ответа с более низким сходством, чем В-клетки памяти IgG. В группе детей, получавших ОМ-85 ВВ, наблюдалось увеличение частоты IgM-продуцирующих клеток на фоне всех антигенов гриппа в образцах предварительной иммунизации. И опять же, вариабельность индивидуальных ответов и малое количество испытуемых ограничивают идентификацию возможной стимулирующей активности бактериального лизата.

Наше исследование опубликовано с целью изучения совместного использования ОМ-85 ВВ и вакцины против гриппа. Несмотря на предыдущие отрицательные результаты исследования относительно иммунного ответа на ПИВ, дальнейшие исследования необходимы для того, чтобы оценить потенциальные преимущества одновременного применения двух вакцин с целью уменьшения рецидивов ОРВИ у детей. Мы использовали ОМ-85 ВВ по схеме проведения вакцинации, рекомендованной в ряде европейских стран (т.е. 10-дневный курс в течение трех месяцев подряд), и первый цикл был завершен за две недели до введения ПИВ. Исходя из этого, можно сделать выводы, что после предварительной стимуляции лизата более позднее введение вакцины может привести к более выраженному иммунному ответу. Разные циклы проведения вакцинации могут давать различные реакции на иммунный ответ к ПИВ, что, собственно, и послужило доказательством того, что одни из лучших клинических результатов были получены путем введения вакцины ОМ-85 ВВ в течение 30 последовательных дней детям с ОРВИ [24]. Польза длительной иммуностимуляции в отношении усиления иммунного ответа на вакцину у пациентов с синдромом Дауна, которые часто имеют нарушение регуляции иммунного ответа, была продемонстрирована *Zuccotti и соавт.* [32]. Длительное введение пидотимода (синтетический дипептид, который имеет различные иммуномодулирующие эффекты от ОМ-85 ВВ) увеличило выработку специфических антител и активность генов, отвечающих за врожденный или приобретенный иммунитет. Дальнейшие исследования будут иметь целью уточнить влияние различных иммуностимулирующих схем на иммунный ответ к вакцинам.

Одним из недостатков этого исследования является его одностороннее слепое происхождение, поскольку не было возможности подготовить плацебо-вакцину, мак-

симально похожую на OM-85 BV. Тем не менее, родители и пациенты были предупреждены о неразглашении предыдущего клинического исследования педиатрам, которые занимались последующими исследованиями. Это, в свою очередь, позволило адекватно оценить эффективность, безопасность и переносимость вакцины OM-85 BV, которая была назначена в первой группе и отсутствовала в группе контроля. Еще одним ограничением является тот факт, что нам не удалось продемонстрировать определенное увеличение специфических антител в группе детей, получавших OM-85 BV, которые могли бы объяснить ее положительное влияние на клинические результаты.

И в заключение хотелось бы отметить, что результаты нашего исследования указывают на то, что введение OM-85 BV не увеличивает гуморальный или клеточно-опосредованный иммунитет к ПИВ. Хотя, вероятно, имеет положительный эффект на частоту новых эпизодов респираторных инфекций у детей с РПИ в анамнезе

и хороший профиль безопасности. В связи с этим, прежде чем сделать какие-либо определенные выводы, необходимо провести ряд дополнительных исследований для проверки влияния вакцины OM-85 BV на иммунный ответ и снижение заболеваемости РПИ.

#### Благодарность

Сусанна Эспозито получила разрешение на исследование от компании GSK, Novartis & Pfizer и денежное вознаграждение от AstraZeneca, Bayern, GSK, Johnson & Johnson, Pfizer и Vifor Pharma. Ни один из авторов не имеет каких-либо коммерческих или других отношений, которые могли бы привести к конфликту интересов.

Данное исследование проводилось при частичном участии Итальянского министерства здравоохранения (Бандо Джовани Ricercatori 2007 г. и 2009 г.). Было получено соответствующее информированное согласие. Исследование проводилось в соответствии с Руководством по проведению экспериментов над человеком.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Principi N, Esposito S, Cavagna R, Bosis S, Droghetti R, Faelli N et al. 2003. Recurrent respiratory tract infections in pediatric age: a population-based survey of the therapeutic role of macrolides. *J Chemother.* 15: 53—9.
- Esposito S, Musio A. 2013. Immunostimulants and prevention of recurrent respiratory tract infections. *J Biol Regul Homeost Agents.* 27: 627—36.
- Cazzola M, Anapurapu S, Page CP. 2012. Polyvalent mechanical bacterial lysate for the prevention of recurrent respiratory infections: a meta-analysis. *Pulm Pharma-col Ther.* 25: 62—8.
- Schaad UB. 2010. OM-85 BV, an immunostimulant in pediatric recurrent respiratory tract infections: a systematic review. *World J Pediatr.* 6: 5—12.
- Esposito S, Marchisio P, Cavagna R, Gironi S, Bosis S, Lambertini L, et al. 2003. Effectiveness of influenza vaccination of children with recurrent respiratory tract infections in reducing respiratory-related morbidity within the households. *Vaccine.* 21: 3162—8.
- Lanzilli G, Falchetti R, Tricarico M, Ungheri D, Fuggetta MP. 2005. In vitro effects of an immunostimulating bacterial lysate on human lymphocyte function. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 18: 245—54.
- Holt PG. 2011. Infection and the development of allergic disease. *Allergy.* 66: Suppl 95: 13—5.
- Bowman LM, Holt PG. 2001. Selective enhancement of systemic Th1 immunity in immunologically immature rats with an orally administered bacterial extract. *Infect Immun.* 69: 3719—27.
- Broncho-vaxom — Package leaflet. Available at: [www.torinomedica.it/farmac/schedetecnica/BronchoVaxom.asp](http://www.torinomedica.it/farmac/schedetecnica/BronchoVaxom.asp). accessed 06.12.13.
- Esposito S, Tagliabue C, Tagliaferri L, Semino M, Longo MR, Principi N. 2012. Preventing influenza in younger children. *Clin Microbiol Infect.* 18: Suppl 5: 42—9.
- Esposito S, Montinaro V, Bosis S, Tagliabue C, Baggi E, Principi N. 2012. Recommendations for the use of influenza vaccine in pediatrics. *Hum Vaccin Immunother.* 8: 102—6.
- Esposito S, Montinaro V, Groppali E, Tenconi R, Semino M, Principi N. 2012. Live attenuated intranasal influenza vaccine. *Hum Vaccin Immunother.* 8: 76—80.
- MedImmune. FluMist — Highlights of prescribing information. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm294307.pdf>. accessed 03.12.13.
- Principi N, Esposito S. 2012. Adjuvanted influenza vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 8: 59—66.
- Esposito S, Marchisio P, Ansaldi F, Bianchini S, Pacei M, Baggi E, et al. 2010. A ran-domized clinical trial assessing immunogenicity and safety of a double dose of virosomal-adjuvanted influenza vaccine administered to unprimed children aged 6—35 months. *Vaccine.* 28: 6137—44.
- Esposito S, Daleno C, Piccioli I, Tagliaferri L, Scala A, Prunotto G, et al. 2011. Immunogenicity and safety of intradermal influenza vaccine in children. *Vaccine.* 29: 7606—10.
- Ansaldi F, Bacilieri S, Durando P, Sticchi L, Valle L, Montomoli E, et al. 2008. Cross-protection by MF59-adjuvanted influenza vaccine: neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibody activity against A(H3N2) drifted influenza viruses. *Vaccine.* 26: 1525—9.
- Setti M, Fenoglio D, Ansaldi F, Filaci G, Bacilieri S, Sticchi L, et al. 2009. Flu vaccination with a virosomal vaccine does not affect clinical course and immunological parameters in scleroderma patients. *Vaccine.* 27: 3367—72.
- Tanzi E, Esposito S, Bojanin J, Amendola A, Trabattini D, Pariani E, et al. 2006. Immunogenicity and effect of a virosomal influenza vaccine on viral replication and T cell activation in HIV-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. *J Med Virol.* 78: 440—5.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) — Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Note for guidance on harmonization of requirements for influenza vaccines (CPMP/BWP/214/96). London; March 1997.
- Kanra G, Marchisio P, Feiterna-Sperling C, Gaedicke G, Lazar H, Durrer P, et al. 2004. Comparison of immunogenicity and tolerability of a virosome-adjuvanted and a split influenza vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J.* 23: 300—6.
- Hesslink DA, Vaessen LMB, Hop WCJ, Schoordijk W, IJzermans JNM, Baan CC, et al. 2005. The effect of renal transplantation on circulating dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 140: 384—93.
- Field J, Gomez-Barreto D, Del-Rio-Navarro BE, Berber A. 1998. Use of OM-85 BV in primary prevention of acute respiratory tract infections in children in orphanages. *Curr Ther Res.* 59: 407—18.
- Schaad UB, Mütterlein R, Goffin H, BV-Child Study Group. 2002. Immunostimulation with OM-85 in children with recurrent infections of the upper respiratory tract: a double-blind, placebo-controlled multicenter study. *Chest.* 122: 2042—9.
- Del-Rio-Navarro BE, Luis Sienna-Monge JJ, Berber A, Torres-Alcantara S, Avila-Castanon L, Gomez-Barreto D. 2003. Use of OM-85 BV in children suffering from recurrent respiratory tract infections and subnormal IgG subclass levels. *Allergol Immunopathol (Madr).* 31: 7—13.
- Razi CH, Harmanci K, Abaci A, Ozdemir O, Hizli S, Renda R, et al. 2010. The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children. *J Allergy Clin Immunol.* 126: 763—9.
- Bitar MA, Saade R. 2013. The role of OM-85 BV (broncho-vaxom) in preventing recurrent acute tonsillitis in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 77: 670—3.
- De Haan A, Hajema BJ, Voorn P, Meijerhof T, van Roosmalen ML, Leenhouts K. 2012. Bacterium-like particles supplemented with

- inactivated influenza anti-gen induce cross-protective influenza-specific antibody responses through intranasal administration. *Vaccine*. 30: 4884–91.
29. Xu ML, Kim HJ, Choi YR, Kim HJ. 2012. Intake of korean red ginseng extract and saponin enhances the protection conferred by vaccination with inactivated influenza a virus. *J Ginseng Res*. 36: 396–402.
30. vZelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Thurnher M. 2001. A clinically approved oral vaccine against pneumotropic bacteria induces the terminal maturation of CD83+ immunostimulatory dendritic cells. *Immunol Lett*. 76: 63–7.
31. Spisek R, Brazova J, Rozkova D, Zapletalova K, Sediva A, Bartunkova J. 2004. Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators. *Vaccine*. 22: 2761–8.
32. Zuccotti GV, Marnetti C, Trabattini D, Beretta S, Biasin M, Guazzarotti L, et al. 2013. Immunomodulating activity of pidotimod in children with Down syndrome. *J Biol Regul Homeost Agents*. 27: 253–8.

**Вплив змішаного бактеріального лізату (OM-85 BV) на імуногенність, безпеку та переносимість інактивованої вакцини проти грипу у дітей із рецидивною інфекцією дихальних шляхів**

*Сусанна Esposito<sup>1</sup>, Паола Marchisio<sup>1</sup>, Елізабета Prada<sup>1</sup>, Кристина Daleno<sup>1</sup>, Лаура Porretti<sup>2</sup>, Рита Carsetti<sup>3</sup>, Анна-Ліза Bosco<sup>1</sup>, Валентина Ierardi<sup>1</sup>, Алессія Scala<sup>1</sup>, Нікола Principi<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Відділення дитячої інтенсивної терапії, кафедра патофізіології та трансплантології Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Мілан, Італія

<sup>2</sup>Відділення цитометрії, Департамент регенеративної медицини, Фонд IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Мілан, Італія

<sup>3</sup>Відділення лабораторій дитячої лікарні Bambino Gesù IRCCS, Рим, Італія

Відомо, що імуногенність і ефективність стандартних інактивованих вакцин проти грипу (IIV) не мають належного результату у дітей. Метою даного проспективного рандомізованого простого сліпого дослідження було порівняти імунну відповідь на ефективність і безпеку вакцини IIV (Fluarix, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium). У дослідженні брали участь 68 дітей із рецидивною респіраторною інфекцією (PPI), середній вік яких складав 36–59 місяців. Дітям була призначена вакцина в комбінації з (n=33) або без (n=35) бактеріального лізату OM-85 BV (Broncho-vaxom, Vifor Pharma, Geneva, Switzerland). OM-85 BV не здійснила ніякого впливу на показники сероконверсії або серопротекції, середнє геометричне значення титрів або дендритні клітини, дані яких не дуже відрізнялись між двома групами. Більш того, застосування вакцини OM-85 BV незначно збільшувало пул В-клітин пам'яті, які виробляють антитіла IgG та IgM проти антигенів грипу. У дітей, які отримували OM-85 BV (p<0,05), була значно нижчою частота PPI, що підтверджує її ефективність. Різниця у частоті побічних ефектів між двома групами не виявлено. Це доводить, що імунна реакція дітей на введення вакцини OM-85 BV проти грипу невиразна. Хоча можна відмітити, що використання OM-85 BV раніше та у комбінації з IIV зменшує кількість випадків захворюваності респіраторними інфекціями, а також є безпечним методом вакцинації.

**Ключові слова:** бактеріальний лізат, діти, грип, вакцина проти грипу, OM-85BV, рецидивна респіраторна інфекція.

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA.2015.5(69):36-43

**Impact of a mixed bacterial lysate (OM-85 BV) on the immunogenicity, safety and tolerability of inactivated influenza vaccine in children with recurrent respiratory tract infection**

*Susanna Esposito<sup>1</sup>, Paola Marchisio<sup>1</sup>, Elisabetta Prada<sup>1</sup>, Cristina Daleno<sup>1</sup>, Laura Porretti<sup>2</sup>, Rita Carsetti<sup>3</sup>, Annalisa Bosco<sup>1</sup>, Valentina Ierardi<sup>1</sup>, Alessia Scala<sup>1</sup>, Nicola Principi<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Pediatric Highly Intensive Care Unit, Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

<sup>2</sup>Cytometry Unit, Department of Regenerative Medicine, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

<sup>3</sup>Department of Laboratories, Bambino Gesù IRCCS Children's Hospital, Rome, Italy

It is known that the immunogenicity and efficacy of conventional inactivated influenza vaccines (IIVs) are not completely satisfactory in children. The aim of this prospective, randomised, single-blind study was to compare the immune response to, and the effectiveness and safety of, an IIV (Fluarix, GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) administered to 68 children aged 36–59 months affected by recurrent respiratory tract infections (RRTIs) who were vaccinated with (n=33) or without (n=35) the mixed bacterial lysate OM-85 BV (Broncho-vaxom, Vifor Pharma, Geneva, Switzerland). OM-85 BV had no effect on seroconversion or seroprotection rates, geometric mean titres, or dendritic cells, which were not significantly different between the two groups. Moreover, OM-85 BV did not significantly increase the pool of the memory B cells that produce IgG and IgM antibodies against the influenza antigens. However, respiratory morbidity was significantly lower in the children treated with OM-85 BV (p<0.05), thus confirming its positive effect on the incidence of RRTIs. There was no difference in the incidence of adverse events between the two groups. These findings show that the immune response of children to influenza vaccine is not significantly influenced by the administration of OM-85 BV. However, the use of OM-85 before and at the same time as IIV seems to reduce respiratory morbidity, and seems to be safe and well tolerated.

**Key words:** Bacterial lysate Children Influenza Influenza vaccine OM-85 BV Recurrent respiratory tract infection.