

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-1-35-42>

Серотипнезависимая протективная активность экспериментальных белоксодержащих препаратов *Streptococcus pneumoniae*, полученных из свежевыделенных и музейных штаммов

О. М. Кукина*¹, И. М. Грубер¹, Н. К. Ахматова¹, Е. А. Курбатова¹, О. В. Жигунова¹, Н. Е. Ястребова¹, И. С. Королёва², Г. В. Белошицкий²

¹ ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва

² ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

Резюме

Актуальность. Вакцины на основе капсульных полисахаридов пневмококка не активны в отношении серотипов, не входящих в состав вакцины, бескапсульных штаммов и не защищают от носительства, вызванного другими серотипами. Их применение приводит к замещению доминирующих серотипов пневмококка, появлению высоковирулентных штаммов, изменению микробного пейзажа слизистых оболочек за счет появления других этиологически значимых возбудителей заболеваний респираторного тракта. Это требует создания внутривидового противопневмококкового иммунитета, чему будет способствовать разработка серотипнезависимых препаратов, в состав которых будут входить белоксодержащие антигены пневмококка. **Цель работы.** Исследование серотипнезависимой протективной активности белоксодержащих антигенных компонентов, полученных из свежевыделенных и музейных штаммов *S. pneumoniae*. **Материалы и методы.** Использованы штаммы трёх серотипов *S. pneumoniae*: музейных – серотипов 6В № 296, 19F № 298 и 10А № 297 и свежевыделенных (из ликвора больных гнойным менингитом) – серотипов 6В № 1121, 19F № 1055 и серогруппы 10 № 1193. В полученных экспериментальных белоксодержащих препаратах (ЭБСП) определяли содержание белка. Протективную активность ЭБСП и вирулентность штаммов определяли при внутрибрюшинных иммунизации и заражения мышей линии BALB/c; LD50 рассчитывали по общепринятой модифицированной формуле Кербера. Иммунофенотип лимфоцитов, предварительно выделенных из цельной крови доноров, изучали с помощью метода проточной цитометрии. Статистический анализ материалов проведен с применением параметрических и непараметрических методов с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows», ver. 7.0 (Stat Soft, Inc); при статистическом анализе уровень значимости *p* принимался равным < 0,05.

Результаты и обсуждение. При культивировании происходило интенсивное накопление биомассы музейного штамма № 296 при низкой его вирулентности и более низкое вирулентного штамма № 1121, выделенного из ликвора больного. По содержанию белка препараты из штаммов серотипа 6В не различались. Штаммы других серотипов, выделенные при генерализованном инфекционном процессе, были более вирулентны, чем музейные. Влияние на иммунофенотип лимфоцитов человека фракций 50–100 кДа, выделенных из исходных препаратов, полученных при культивировании штаммов серотипа 6В значительно возрастало только под действием препарата из музейного штамма. При исследовании протективной активности исходных препаратов из штаммов серотипа 6В и фракций с ММ 50–100 кДа только при трёхкратной иммунизации исходным препаратом из штамма № 296, в дозе 20 мкг белка на мышь, выявлена существенно большая выживаемость иммунизированных мышей, от заражения свежевыделенным вирулентным штаммом № 1121 гомологичного серотипа. Фракция 30–100 кДа обеспечила защиту мышей, двукратно иммунизированных 50 мкг белка на мышь, с высоким индексом эффективности, равным 8,9, даже после заражения свежевыделенным штаммом гетерологичного серотипа *S. pneumoniae* – серотипа 3 № 10196.

Выводы. Белоксодержащая фракция с ММ 30–100 кДа, полученная из слабовирулентного музейного штамма *S. pneumoniae* серотипа 6В № 296, при двукратной иммунизации обладала протективной активностью в отношении свежевыделенного вирулентного штамма гетерологичного серотипа. Под действием изученных белоксодержащих фракций показана активация клеточного звена иммунной системы с вовлечением врожденных эффекторов и Т-лимфоцитов. Эти данные можно считать обоснованием дальнейшего изучения ЭБСП для оценки возможности их использования при конструировании противопневмококкового препарата с серотипнезависимой протективной активностью.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, серотипнезависимая протективная активность, вирулентность, экспериментальный белоксодержащий препарат

Конфликт интересов не заявлен.

* Для переписки: Кукина Ольга Максимовна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной микробиологии НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова/+7 (495)-916-20-47, kukina1994@mail.ru, ©Кукина О. М. и др.

Для цитирования: Кукина О. М., Грубер И. М., Ахматова Н. К. и др. Серотипнезависимая протективная активность экспериментальных белоксодержащих препаратов *Streptococcus pneumoniae*, полученных из свежeweделенных и музейных штаммов. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2020; 19 (1): 35–42. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-1-35-42>.

Experimental Protein-Containing Preparations *Streptococcus pneumoniae*, Obtained from Fresh Isolated Strains and Museum

OM Kukina^{**1}, IM Gruber¹, NK Akhmatova¹, EA Kurbatova¹, OV Zhigunova¹, NE Yastrebova¹, IS Koroleva², GV Beloshitsky²

¹ Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

² Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

Abstract

Relevance. Vaccines based on capsular polysaccharides of pneumococci are not active against serotypes that are not included in the vaccine, non-capsulated strains and do not protect against carriage caused by other serotypes. Their use leads to the replacement of dominant serotypes of pneumococci, the appearance of highly virulent strains, changes in the microbial landscape of mucous membranes due to the appearance of other etiologically significant pathogens of respiratory tract diseases. This requires the creation of intraspecific anti-pneumococcal immunity, which will be facilitated by the development of serotype-dependent drugs, which will include protein-containing antigens of pneumococci. **Objective.** Study of serotype-independent activity of protein-containing antigenic components obtained from freshly isolated and archival strains of *S. pneumoniae*.

Materials and methods. Strains of three serotypes of *S. pneumoniae* were used: archival strains of serotypes 6B N296, 19F N 298 and 10A N297 and freshly isolated serotypes 6B N 1121, 19F N 1055 and serogroup 10 N 1193 (from the cerebrospinal fluid of patients with purulent meningitis). In the experimental protein-containing preparations EPCP obtained, the protein content was determined. Protective activity of EPCP and virulence of strains were determined in the model of intraperitoneal immunization and infection of BALB/c mice; LD50 was calculated using the generally accepted modified Kerber formula. The immunophenotype of lymphocytes previously isolated from donor-mice whole blood was studied by flow cytometry. Statistical analysis of the materials was carried out using parametric and nonparametric methods using the application package «Statistica for Windows», ver. 7.0 (Stat Soft, Inc); in statistical analysis, the significance level of *p* was assumed to be < 0.05. **Results and discussion.** During cultivation there was the analysis of growth dynamics showed intensive accumulation of biomass of the archival strain N296 with low virulence, and lower – by virulent strain N 1121 isolated from the patient's cerebrospinal fluid. The protein content of drugs from serotype 6B strains did not differ. The strains of other serotypes isolated during the generalized infectious process were also more virulent than the archival strain. The effect on the immunophenotype of human lymphocytes of fractions of 50–100 kDa isolated from the initial preparations obtained by culturing serotype 6B, significantly increased only under the influence of the preparation from the archival strain. In the study of protective activity of the initial preparations from strains of serotype 6B and fractions with MM 50–100 kDa only triple immunization with the initial preparation from strain N 296, at a dose of 20 micrograms of protein per mouse, led to significantly greater survival of immunized mice from infection with the newly isolated virulent strain N 1121 of homologous serotype. A fraction of 30–100 kDa provided protection of mice twice immunized with 50 mkg of protein per mouse, with a high efficacy index of 8.9, even after infection with a freshly isolated strain of heterologous *S. pneumoniae* serotype 3 N 10196. **Conclusion.** The protein-containing fraction with MM 30–100 kDa obtained from a low virulent archival strain of *S. pneumoniae* serotype 6B N296 possessed protective activity against a newly isolated virulent strain of heterologous serotype after double immunization. Under the action of the studied protein-containing fractions, activation of the cellular component of immune system with the involvement of innate immunity effectors and T-lymphocytes is shown. These data can be considered as a evidence for further study of EPCP to assess the possibility of their use in the design of anti-pneumococcal drug with serotype-independent protective activity.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, serotype-independent protective activity, virulence, experimental protein-containing preparation

No conflict of interest to declare.

For citation: Experimental Protein-Containing Preparations *Streptococcus pneumoniae*, Obtained from Fresh Isolated Strains and Museum Kukina OM, Gruber IM, Akhmatova NK et al. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020; 19 (1): 35–42 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-1-35-42>.

Введение

Во всем мире *S. pneumoniae* является возбудителем одних из самых распространенных инфекционных заболеваний, протекающих часто как в виде неинвазивных процессов (отит, конъюнктивит,

синусит, пневмония без бактериемии), так и тяжёлых инвазивных (сепсис, менингит, пневмония, сопровождающаяся плевритом) способных привести к летальному исходу, особенно у детей до 5 лет и людей старше 65 лет. Для профилактики

^{**} For correspondence: junior researcher of the Laboratory of experimental microbiology of Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera. +7 (495)-916-20-47, kukina1994@mail.ru. ©Kukina OM et al.

пневмококковых инфекционных заболеваний применяют полисахаридные и конъюгированные пневмококковые вакцины, вызывающие выработку антител к капсульным полисахаридам актуальных серотипов пневмококка, входящих в состав импортных вакцин, без учета циркуляции клинически значимых серотипов пневмококка на территории РФ. Внедрение в практику пневмококковых конъюгированных вакцин (ПКВ), охватывающих от 7 до 13 серотипов пневмококков, ожидаемо вывело из циркуляции бактерии вакцинных серотипов [1,2]. Резко снизилось число инвазивных форм пневмококковой инфекции, которые были ассоциированы преимущественно с этими серотипами. В то же время, ПКВ оказали выраженное влияние на структуру пневмококковой популяции, в которой появились невакцинные серотипы и выросла доля ранее редких генетических линий и клонов (серотип 19А и его клон ST320, отличающийся множественной устойчивостью к антибиотикам) [3].

На фоне проведения массовой вакцинации, отмечается замещение доминирующих серотипов пневмококка, появление высоковирулентных штаммов, изменение микробного пейзажа слизистых оболочек за счет появления других этиологически значимых возбудителей заболеваний респираторного тракта [4–7]. Внедрение в 2014 г. в России в практику вакцинации пневмококковых конъюгированных вакцин (ПКВ) требует постоянного мониторинга циркулирующих серотипов, поскольку значимое изменение серотипового состава под давлением ПКВ на популяционном уровне можно ожидать не ранее, чем через 5 лет после начала ее применения при условии высокого охвата вакцинацией [8].

Вакцины на основе капсульного полисахарида не активны в отношении серотипов, не входящих в состав вакцины, бескапсульных штаммов и не защищают от носительства, вызванного другими серотипами пневмококка, которых насчитывается более 90. Всё это вызывает необходимость разработки серотипнезависимых, основанных на белках, и цельноклеточных вакцин [9,10].

Таким образом, одним из актуальных направлений совершенствования пневмококковых вакцин является использование белков пневмококка с внутривидовой перекрестной протективной активностью в качестве серотипнезависимых вакцин и новых белков-носителей. Известно, что ни один отдельный белок не может создать эффективную перекрестную защиту от всех серотипов пневмококка, необходимо использовать комплекс белков для создания внутривидового противопневмококкового иммунитета [11,12]. Несколько белоксодержащих вакцин находятся на разных стадиях клинических испытаний [10], однако коммерческих препаратов на мировом фармацевтическом рынке не зарегистрировано.

В проведенных ранее исследованиях было показано, что белоксодержащие антигены штаммов

серотипов 6В, 10А и 19F индуцировали наибольший перекрестный протективный эффект [13], в связи с чем в настоящей работе использованы эти штаммы, а как основной объект исследования выбран штамм серотипа 6В.

Цель работы – изучить серотипнезависимую протективную активность белоксодержащих антигенных компонентов, полученных из свежeweделенных и музейных штаммов *S. pneumoniae*.

Материалы и методы

Исследования проведены на модели штаммов *S. pneumoniae* трёх музейных, депонированных в 2016 г серотипов: 6В № 296, 19F № 298 и 10А № 297, и на свежeweделенных штаммах серотипов 6В № 1121, 19F № 1055 и серогруппы 10 № 1193, выделенных из ликвора больных гнойным менингитом (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Периодическое культивирование штаммов проводили в полусинтетической среде [14] в стационарных условиях при 5% CO₂ в течение 5–7ч (до конца фазы экспоненциального роста). В качестве посевной использовали 24-часовую бактериальную культуру, выросшую на кровяном агаре. Ростовые свойства штаммов оценивали по динамике накопления биомассы на основании расчета продуктивности процесса по среднему увеличению количества микробных клеток (м.к.) в час (q_x , м.к./ч), максимальной удельной скорости роста (μ_{max} , ч⁻¹) и числу прошедших генераций (n) [15].

После центрифугирования микробную массу инактивировали и высушивали диметилкетонем, проводили водную экстракцию и лиофилизацию (исходный препарат); с помощью фильтров Amikon получали фракции с ММ 30–50, 50–100 и 30–100 kDa. В полученных экспериментальных белоксодержащих препаратах (ЭБСП) определяли содержание белка [16].

Протективную активность ЭБСП и вирулентность штаммов определяли при внутрибрюшинных (в/бр) иммунизации и заражении мышей линии BALB/c (320 самцов, 12–14 г), полученных из питомника филиал Андреевка ГУ НЦБМТ. Протективную активность изучали в опытах активной защиты мышей при заражении иммунизированных мышей (опытная группа) и интактных неиммунизированных мышей (контрольная группа), свежeweделенными штаммами *S. pneumoniae* серотипов 6В № 1121 и 3 № 10196 (выделенного в НЦЗД РАМН). Все эксперименты на животных проводили в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217-2014). LD₅₀ рассчитывали по общепринятой модифицированной формуле Кербера; использован t -критерий Стьюдента и непараметрический критерий согласия Пирсона – χ^2 [17]. В динамике выживаемости мышей рассчитывали по методу Гланса С. А. [18].

Для изучения иммунофенотипа лимфоцитов предварительно были выделены мононуклеарные

Таблица 1. Параметры роста и вирулентность штаммов *S. pneumoniae* серотипа 6B разного происхождения
Table 1. Growth parameters and virulence of *S. pneumoniae* serotype 6B strains of different origin

Штамм Strain		Параметры роста Growth parameters					LD ₅₀ , м.к. microbial cell
		Длительность фаз роста, ч Duration of growth phases, h		μ max, ч. ⁻¹ / через ч. от начала выращивания μ max, h ⁻¹ / through h. from the beginning of cultivation	q _x , м.к./ч microbial cell/h	n	
№	Происхождение Origin	Лag-ф Lag-phase	Лог-ф Log-phase				
296	Музейный Archival	0–2,0	4,0–4,5	1,92 ± 0,27/2–3	0,97	7,48 ± 3,06	> 10 ⁹
1121	Свежевыделенный Freshly isolated	3,5–4,0	3,5–4,0	1,36 ± 0,05/6	0,41	5,35 ± 1,07	4,36*10 ⁵

лейкоциты из цельной крови доноров в градиенте плотности фиколл-урографина и далее 10 млн клеток/мл в ростовой среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS) и антибиотика (стрептомицин) инкубировали с 15 мкл ЭБСП (5 мкг белка) в течение 72 часов. Иммунофенотип лимфоцитов изучали с помощью метода проточной цитометрии на приборе FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием FITC- и PE-меченых моноклональных антител (МАТ) к CD45/CD3, CD45/CD3/CD4, CD45/CD3/CD8, CD16/56, CD3/CD16/56, CD45/CD19, CD8/HLA-DR (eBioscience, США).

Статистический анализ материалов был проведен с применением параметрических и непараметрических методов с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows», ver. 7.0 (Stat Soft, Inc). Средние выборочные значения количественных признаков приведены в виде Me (Q1,25;Q2,75), где Me — медиана, Q1 — нижний квартиль, Q2 — верхний квартиль; использованы непараметрические методы — критерий Крускал-Уоллиса, U-критерий Манна-Уитни. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости p принимался равным < 0,05.

Результаты и обсуждение

При культивировании на кровяном агаре изучаемые штаммы *S. pneumoniae* серотипа 6B были представлены колониями разного типа, в зависимости от происхождения: музейный штамм № 296 представлен очень мелкими круглыми прозрачными колониями с ровными краями; колонии штамма № 1121, выделенного от больного генерализованной формой (гнойный менингит), в виде плоских прозрачных колоний с валиком по краю, приподнятым центром и неровной поверхностью; у этого штамма отмечена наиболее выраженная капсула.

Анализ динамики роста исследуемых штаммов на основании изученных параметров роста позволил выявить интенсивное накопление биомассы при культивировании музейного штамма № 296: короткая лаг-фаза; высокая максимальная удельная скорость роста; высокая продуктивность процесса накопления биомассы при низкой вирулентности штамма (табл. 1). В тоже время, штамм № 1121, выделенный из ликвора больного (гнойный менингит) был вирулентным, но характеризовался более низкими показателями роста.

При сравнительном изучении вирулентности штаммов *S. pneumoniae* других серотипов разного

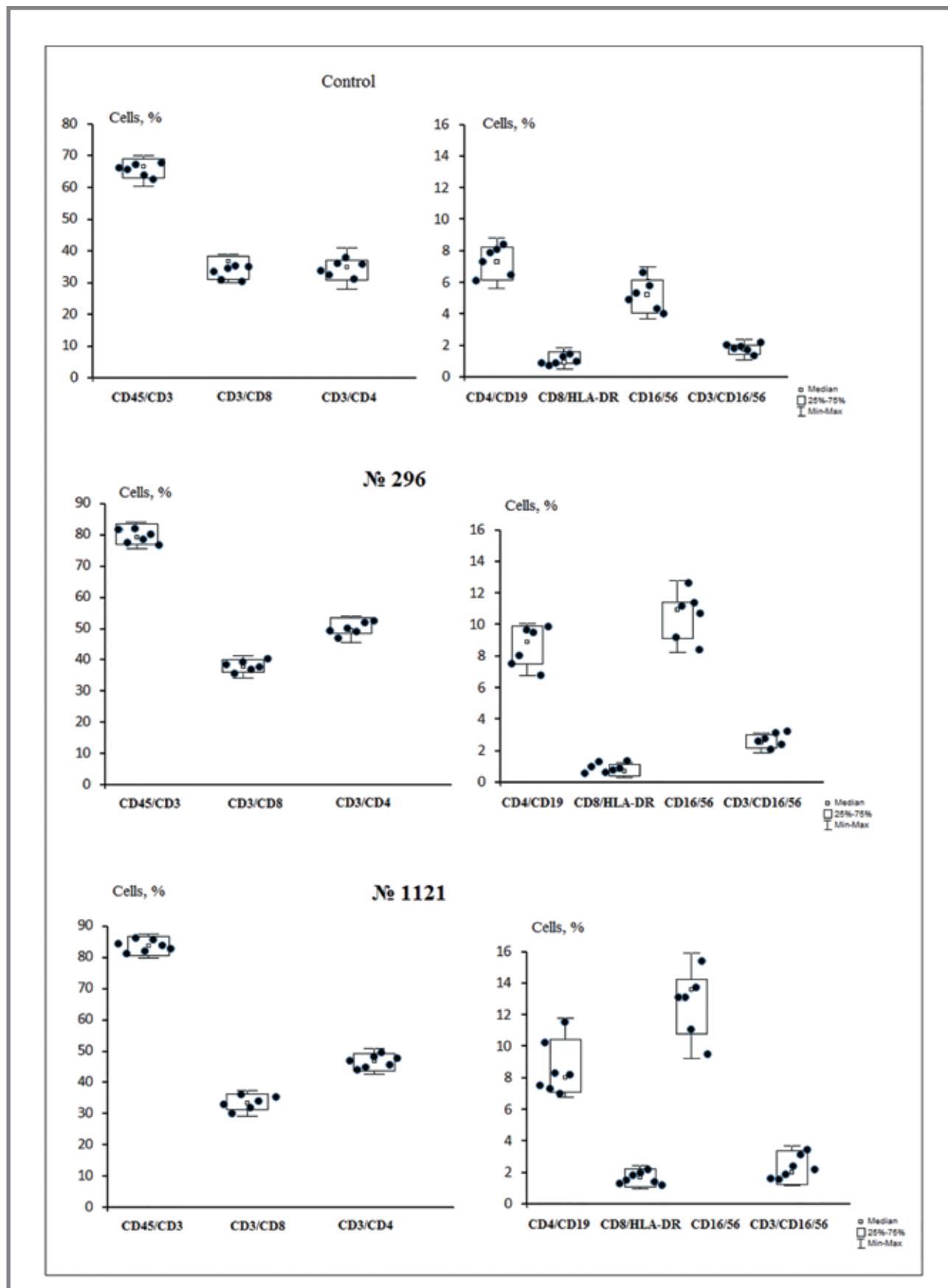
Таблица 2. Содержание белка в экспериментальных белоксодержащих препаратах (ЭБСП)*
Table 2. Protein content in experimental protein-containing preparations (EPCP)*

Название ЭБСП Name of EPCP	Содержание белка в ЭБСП из штаммов Containing of protein in EPCP from strains	
	№ 296	№ 1121
Исходный препарат Initial drug	209 ± 33 мкг/мл с.в** mkg/mL d.w.	219 ± 35 мкг/мл с.в mkg/mL d.w.
Фракция 50–100 kDa Fraction 50–100 kDa	348 ± 21 мкг/мл mkg/mL	329 ± 45 мкг/мл mkg/mL
Фракция 30–50 kDa Fraction 30–50 kDa	299 ± 73 мкг/мл mkg/mL	281 ± 0,7 мкг/мл mkg/mL

Примечание: *средние данные по 3 экспериментам; **с.в. – сухой вес.
 Note: *average data for 3 experiments; **d.w. – dry weight.

Рисунок 1. Влияние ЭБСП *S. pneumoniae* (из штаммов № 296 и №1121, фракция 50–100 kDa) на иммунофенотип лимфоцитов периферической крови у доноров *in vitro*

Figure 1. Influence of *S. pneumoniae* e EPCP (from strains N 296 and N 1121, fraction 50–100 kDa) on immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in donors *in vitro*



Примечание: Данные представлены индивидуальными значениями содержания CD-экспрессирующих клеток и Me [Q1-Q2]. Kruskal-Wallis ANOVA & Median test.

Note: The data are presented by individual values of CD-expressing cells and Me [Q1-Q2]. Kruskal-Wallis ANOVA & Median test.

Таблица 3. Протективная активность белоксодержащих препаратов, полученных из штаммов различного происхождения, при заражении мышей свежeweделенным штаммом гомологичного серотипа
Table 3. Protective activity of protein-containing preparations obtained from strains of different origin during infection of mice with freshly isolated strain of homologous serotype

Штамм <i>S. pneumoniae</i> серотипа 6В для получения иммуногена <i>S. pneumoniae</i> strain of serotype 6В for obtaining the immunogen	Белоксодержащий препарат для иммунизации Protein-containing preparation for immunization	Кратность иммунизации The multiplicity of immunization			
		Двукратная Double		Трехкратная Triple	
		Выжило/всего Alive/total	p	Выжило/всего Alive/total	p/Z
Музейный, № 296 Archival	Исходный initial	6/10	> 0,05	4/7*	< 0,05/2,92
	50–100 kDa	2/10	> 0,05	3/7**	> 0,05/2,04
Свежeweделенный, №1121 Freshly isolated	Исходный initial	4/10	> 0,05	3/7**	> 0,05/2,04
	50–100 kDa	1/10	> 0,05	2/7**	> 0,05/1,76
Контроль заражающей дозы штамма №1121 Control of the infecting dose of the strain	10 ⁶	1/5		2/3	–
	10 ⁷	2/5		2/5	
	10 ⁸	3/8		0/5	–
LD ₅₀ , м.к. microbial cells		3 x 10 ⁶		3,7 x 10 ⁶	–

Примечание: Достоверность различий между опытом и контролем (для заражающей дозы 10⁸ м.к.); * Z=2,92, p < 0,05 при критическом значении > 2,23 (при 12 мышях в опыте). **Z = 2,04 и 1,76, p > 0,05, при критическом значении > 2,23 (при 12 мышях в опыте).
 Note: significance of differences between experience and control (for an infecting dose of 10⁸ microbial cells); * Z=2,92, p < 0,05, at critical value > 2,23 (with 20 mice in the experiment) **Z = 2,04 and 1,76, p > 0,05, at critical value (with 12 mice in the experiment).

происхождения установлено, что музейные штаммы серотипов 10А и 19F, отобранные ранее, поскольку индуцировали наибольший перекрестный протективный эффект [13], обладали низкой вирулентностью (LD₅₀ > 10⁹ м.к.), в то время как штаммы, выделенные из ликвора больных при генерализованном инфекционном процессе (гноенный менингит), были более вирулентны (LD₅₀ 2,29*10⁷ и 3,16*10⁸ соответственно). Учитывая наибольшую вирулентность штамма № 1121 серотипа 6В из приведенных свежeweделенных штаммов, дальнейшие исследования были направлены на изучение экспериментальных белоксодержащих препаратов, выделенных из штаммов серотипа 6В различной вирулентности.

При изучении экспериментальных белоксодержащих препаратов – исходных и выделенных из них фракций 30–50 и 50–100 кДа определено, что по содержанию белка препараты из изучаемых штаммов серотипа 6В № 296 и № 1121 не различаются (табл. 2).

Исследование влияния на иммунофенотип лимфоцитов человека фракций 50–100 кДа, выделенных из исходных препаратов, полученных при культивировании штаммов № 296 и № 1121, показало, что после 72-х часовой инкубации в присутствии фракций выявлено изменение численности клеток по сравнению с контролем (без препаратов) (рис. 1). Достоверно повышалась численность

Т-клеток (CD45+/CD3+), p < 0,001, а так же количество Т-хелперов (CD45+/CD3+/CD4+) и NK-клеток (CD16+/56+), p < 0,0003 и p < 0,05 соответственно. Уровень NKT-клеток (CD3+/CD16/56+) значимо возрастал только под влиянием препарата из штамма № 296 (p < 0,037). Таким образом, изученные препараты *S. pneumoniae* индуцировали изменение численности иммунных клеток в культуре клеток, что свидетельствует об активации клеточного звена иммунитета с вовлечением врожденных эффекторов и Т-лимфоцитов.

При исследовании протективной активности исходных препаратов из штаммов серотипа 6В и фракций с ММ 50–100 кДа мышей по двукратной и трехкратной схеме иммунизировали в/бр дозой 20 мкг белка/мышь (в объеме 0,5мл) с 14-дневным интервалом. Заражение проводили через 14 суток после последней иммунизации вирулентным штаммом гомологичного серотипа 6В № 1121 в дозе 10⁸ м.к. (в 0,5мл), составляющей 33 и 27 LD₅₀ (LD₅₀ 3 x 10⁶–3,7 x 10⁶ м.к.) (табл. 3). Установлено, что двукратная иммунизация не защищала от заражения мышей, иммунизированных указанной дозой. После трехкратной иммунизации выявлена существенно большая выживаемость мышей, иммунизированных исходным препаратом только из маловирулентного музейного штамма № 296 по сравнению с группой контроля (p < 0,05) и отмечена тенденция к защите фракцией с ММ

Таблица 4. Протективная активность фракции 30–100 кДа при заражении мышей свежeweделенным штаммом гетерологического серотипа
Table 4. Protective activity of 30–100 kDa fraction in mice infected with freshly isolated strain of heterologous serotype

Иммуноген Immunogen	Заражающая доза штамма <i>S. pneumoniae</i> серотипа 3 № 10196, м.к. Infecting dose of <i>S. pneumoniae</i> strain serotype 3 N10196, microbial cells	Выжило/всего, сут Alive/total, days					LD ₅₀ м.к. Microbial cells	ИЭ EI - Effi-cacy index
		2	3	4	7	8		
Фракция 30-100 кДа штамма <i>S. pneumoniae</i> серотипа 6 В №296 Fraction 30–100 kDa of <i>S. pneumoniae</i> strain serotype 6B N296	10 ³	8/10	4/10	4/10	4/10	4/10	5012* ** ***	8,9
	10 ⁴	6/10	6/10	6/10	6/10	6/10		
	10 ⁵	4/5	1/5	1/5	1/5	1/5		
Контроль Control	10 ³	8/8	2/8	2/8	2/8	2/8	562	–
	10 ⁴	5/10	0/10	0/10	0/10	0/10		
	10 ⁵	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

Примечание: Достоверность различий между опытом и контролем для заражающей дозы 10⁴ м.к.: *при сравнении кривых выживаемости по С.А. Гланцу по критерию значимости $Z = 2,28$, $p < 0,05$ при критическом значении $\geq 2,086$ (при 20 мышях в опыте); **по критерию согласия $\chi^2 = 5,95$, $p < 0,02$; ***по критерию Стьюдента $t_p = 2,98$, $p < 0,01$.

Note: Significance of differences between experiment and control for the infecting dose 10⁴ microbial cells: *when comparing survival curves by S. A. Glantz criterion by significance $Z = 2,28$, $p < 0,05$, at a critical value $\geq 2,086$ (with 20 mice in the experiment),; **according to the criterion of consent $\chi^2 = 5.95$, $p < 0.02$; ***according to Student's criterion $t_p = 2,98$, $p < 0,01$.

50–100 кДа. В тоже время препараты из свежeweделенного штамма не защищали от заражения большой дозой (33–27 LD₅₀) этого вирулентного штамма.

В связи с тем, что было показано отсутствие выраженного протективного эффекта фракции 50–100 кДа, в последующих исследованиях использовали фракцию 30–100 кДа, полученную из штамма № 296 и большую иммунизирующую дозу. Изучение протективной активности фракции 30–100 кДа, выделенной из исходного препарата, полученного при культивировании музейного штамма *S. pneumoniae* 6В № 296, показало защиту мышей, двукратно иммунизированных 50 мкг белка на мыш, после заражения даже штаммом свежeweделенного гетерологического серотипа – *S. pneumoniae* серотипа 3 № 10196 (табл. 4). При этом достоверность разницы между опытом и контролем – $p < 0,05$, а индекс эффективности (ИЭ), то есть отношение LD₅₀ в опыте к LD₅₀ в контроле, составил 8,9.

Выводы

1. Белоксодержащая фракция с ММ 30–100 кДа, полученная из слабовирулентного музейного штамма *S. pneumoniae* серотипа 6 В № 296, при двукратной иммунизации обладала протективной активностью в отношении свежeweделенного вирулентного штамма гетерологического серотипа.
2. Показана активация клеточного звена иммунитета с вовлечением врожденных эффекторов и Т-лимфоцитов под действием белоксодержащих фракций, полученных из штаммов *S. pneumoniae*.
3. Приведенные данные являются обоснованием дальнейших исследований по выявлению спектра внутривидовой протективной активности изучаемых экспериментальных препаратов для оценки возможности их использования при конструировании противопневмококкового препарата с серотипнезависимой протективной активностью.

Литература

1. Richter SS, Diekema DJ, Heilmann KP et al. Changes in pneumococcal serotypes and antimicrobial resistance after introduction of the 13-valent conjugate vaccine in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58: 6484–6489. DOI: 10.1128/AAC.03344-14
2. Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet*. 2011; 378: 1962–1973. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62225-8
3. Маянский Н. А., Савинова Т. А., Алябьева О. А. и др. Антибиотикорезистентность и клональная эволюция *Streptococcus pneumoniae* серотипа 19А в России, 2003–2013 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. // 2017. Т. 19, № 2. С. 145–151.
4. Feldman C, Anderson R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines // *Journal of Infection*. 2014; 69 (4): 309–325.
5. Poland GA. The prevention of pneumococcal disease by vaccines: promises and challenges. // *Infectious Disease Clinics of North America*. 2001. Vol. 15. P. 97–122.
6. Hicks LA, Harrison LH, Flannery B et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination. 1998–2004. // *The Journal of Infectious Diseases*. 2007. Vol. 196. P. 1346–1354.
7. Pelton SI, Huot H, Finkelstein JA et al. Emergence of 19A as virulent and multidrug resistant pneumococcus in Massachusetts following universal immunization of infants with pneumococcal conjugate vaccine. // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2007. Vol. 26. N 6. P. 468–472.
8. Piliashvili T, Bennett NM. Pneumococcal disease prevention among adults: strategies for the use of pneumococcal vaccines. // *The American Journal of Preventive Medicine*. 2015. Vol. 49, N 4. P. 383–390.

Original Articles

9. Pichichero ME, Khan MN, Xu Q. Next generation protein based *Streptococcus pneumoniae* vaccines. // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2016. Vol. 12. N1. P. 194–205.
10. Pichichero ME. Pneumococcal whole-cell and protein –based vaccines: Changing the paradigm. *Expert Review of Vaccines*. 2017; Vol. 16. N12. P. 1181–1190.
11. Darrieux M., Goulart C., Briles D., Leite LC. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines. *Critical Reviews in Microbiology*. 2015. Vol. 41. N. 2. P. 190–200.
12. Principi N, Esposito S. Development of pneumococcal vaccines over the last 10 years. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2018. Vol. 18. N1. P. 7–17.
13. Курбатова Е.А., Воробьев Д.С., Егорова Н.Б. и др. Штаммовые различия внутривидовой иммуногенной активности антигенных компонентов *Streptococcus pneumoniae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013. № 5. С. 60–69.
14. Грищенко Н.В., Токарская М.М., Калина Н.Г. и др. Влияние состава питательной среды на продукцию капсульного полисахарида *S. pneumoniae* типа 19А. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2012. №2. С. 12–17.
15. Перт С.Дж., ред. Работнова И.Л. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир; 1978.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 193. N1. P. 265–275.
17. Юнкеров В.И., Григорьев С. Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб. 2001. 266 с.
18. Планица С.А. Медико-биологическая статистика. М.: Издательство «Практика»; 1999.

References

1. Richter SS, Diekema DJ, Heilmann KP et al. Changes in pneumococcal serotypes and antimicrobial resistance after introduction of the 13-valent conjugate vaccine in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58: 6484–9. DOI: 10.1128/AAC.03344-14
2. Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet*. 2011; 378 (9807):1962–73. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62225-8
3. Mayansky NA, Savinova TA, Alyabyeva NM. et al. Antimicrobial resistance and clonal evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in Russia during 2002–2013. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2017; 19 (2): 145–51 (In Russ.).
4. Feldman C, Anderson R. Review: current and new generation pneumococcal vaccines. *Journal of Infection*. 2014; 69 (4): 309–25. DOI: 10.1016/j.jinf.2014.06.006.
5. Poland GA. The prevention of pneumococcal disease by vaccines: promises and challenges. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2001; 15:97–122. DOI: 10.1016/S0891-5520(05)70270-1.
6. Hicks LA, Harison LH, Flannery B et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination. 1998–2004. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007; 196:1346–54. DOI: 10.1086/521626
7. Pelton SL, Huot H, Finkelstein JA. et al. Emergence of 19A as virulent and multidrug resistant pneumococcus in Massachusetts following universal immunization of infants with pneumococcal conjugate vaccine. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2007; 26 (6):468–72. DOI: 10.1097/inf.0b013e31803df9ca
8. Pillishvili T, Bennett NM. Pneumococcal disease prevention among adults: strategies for the use of pneumococcal vaccines. *The American Journal of Preventive Medicine*. 2015; 49(4):383–90. DOI: 10.1016/j.ajpm.2015.05.102
9. Pichichero ME, Khan MN, Xu Q. Next generation protein based *Streptococcus pneumoniae* vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2016; 12 (1): 194–205. DOI: 10.1080/21645515.2015.1052198.
10. Pichichero ME. Pneumococcal whole-cell and protein –based vaccines: Changing the paradigm. *Expert Review of Vaccines*. 2017; 6 (12): 1181–90. DOI: 10.1080/14760584.2017.1393335.
11. Darrieux M, Goulart C, Briles D, Leite LC. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines. *Critical Reviews in Microbiology*. 2015; 41(2):190–200. DOI: 10.3109/1040841X.2013.813902.
12. Principi N, Esposito S. Development of pneumococcal vaccines over the last 10 years. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2018; 18 (1): 7–17. DOI: 10.1080/14712598.2018.1384462.
13. Kurbatova EA, Vorobiev DS, Egorova NB et al. Strain difference of intra-species immunogenic activity of *Streptococcus pneumoniae* antigen components. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. Moscow. 2013; 5: 60–9 (In Russ.).
14. Grischenko NV, Tokarskaya MM, Kalina NG, et al. Influence of nutrient medium composition on the production of capsule polysaccharide by *Streptococcus pneumoniae* 19A serotype. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. Moscow. 2012; 2: 12–7 (In Russ.).
15. Pirt SJ. Principles of microbe and cell cultivation / S.J. Pirt // Ed. Professor I.L. Rabotnova. Moscow: Mir. 1978 (In Russ.).
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951, 193 (1): 265–275.
17. Yunkеров VI, Grigoriev SG. Mathematical and statistical processing of medical research data. Saint Petersburg. 2001: 266 (In Russ.).
18. Glantz SA. Primer of biostatistics. 4th ed. Moscow: Praktika; 1999 (In Russ.).

Об авторах

- **Ольга Максимовна Кукина** – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной микробиологии НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. +7 (495)-916-20-47, kukina1994@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0875-4141>
- **Ирина Мироновна Грубер** – д. м. н., профессор, заведующая лабораторией экспериментальной микробиологии НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. +7 (495)-916-20-47, igruber_instmech@mail.ru.
- **Нэлли Кимовна Ахматова** – д. м. н., заведующая лабораторией механизмов регуляции иммунитета НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. +7 (919)-7765570, anelly@mail.ru.
- **Екатерина Алексеевна Курбатова** – д. м. н., профессор, заведующая лабораторией терапевтических вакцин НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. +7(495)-917-57-74, kurbatova6162@yandex.ru.
- **Ольга Валерьевна Жигунова** – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной микробиологии НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. +7(495)-916-20-47, kileva@mail.ru.
- **Наталья Евгеньевна Ястребова** – д. м. н., профессор, заведующая лабораторией иммунохимической диагностики НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. +7 (495)-917-07-41, yastreb03@rambler.ru.
- **Ирина Станиславовна Королева** – д. м. н., заведующая лабораторией эпидемиологии менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов ЦНИИ эпидемиологии. +7 (495)-672-11-28, irina-korol@yandex.ru.
- **Григорий Владимирович Белошицкий** – старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов ЦНИИ эпидемиологии, +7 (495)-672-11-28, g-belosh1@yandex.ru.

Поступила: 17.12.2019. Принята к печати: 05.02.2020.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Olga M. Kukina** – junior researcher of the laboratory of experimental microbiology, Mechnikov of Research Institute of Vaccines and Sera. +7 (495)-916-20-47, kukina1994@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0875-4141>.
- **Irina M. Gruber** – Dr. Sci (Med), professor, head of the laboratory of experimental microbiology of Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera. +7 (495)-916-20-47, igruber_instmech@mail.ru.
- **Nelli K. Akhmatova** – Dr. Sci (Med), head of the laboratory of immunity regulation mechanisms, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, +7 (919)-7765570, anelly@mail.ru.
- **Ekaterina A. Kurbatova** – Dr. Sci (Med), professor, head of the laboratory of therapeutic vaccines, Mechnikov of Research Institute of Vaccines and Sera, +7 (495) -917-57-74, kurbatova6162@yandex.ru.
- **Olga V. Zhigunova** – junior researcher of the laboratory of experimental microbiology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, +7 (495)-916-20-47, kileva@mail.ru.
- **Natalia E. Yastrebova** – Dr. Sci (Med), professor, head of the laboratory of immunochemical diagnostics, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, +7 (495) -917-07-4, e-mail: yastreb03@rambler.ru.
- **Irina S. Koroleva** – Dr. Sci (Med), head of the laboratory of epidemiology of meningococcal infection and purulent bacterial meningitis, Central Research Institute of Epidemiology, Russian Federation, 8 (495) -672-11-28; e-mail: irina-korol@yandex.ru.
- **Grigory V. Beloshitsky** – senior researcher of the laboratory of epidemiology of meningococcal infection and purulent bacterial meningitis, Central Research Institute of Epidemiology, Russian Federation, +7 (495) -672-11-28, g-belosh1@yandex.ru.

Received: 17.12.2019. Accepted: 05.02.2020.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.