

Иммуногенная активность секретлируемых белоксодержащих соединений *Staphylococcus aureus* № 6

И.М. Грубер¹ (igruber_instmech@mail.ru), Е.А. Асташкина¹ (selena7-87@rambler.ru), О.В. Лебединская² (lebedinska@mail.ru), Н.Б. Егорова¹, М.В. Киселевский³ (kisele@inbox.ru), Ф.В. Доненко³ (f20005@list.ru), Н.Е. Ястребова¹, О.М. Игнатова¹, Е.А. Курбатова¹, Л.С. Черкасова¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва

²ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России

³ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва

Резюме

Трудность терапии инфекций, вызываемых *S. aureus*, определяется резистентностью возбудителя к применяемым антибиотикам, хроническим характером течения болезни, а также развитием на ее фоне снижения функций врожденного иммунитета и резистентности организма к инфекции. Несмотря на многочисленные усилия исследователей, в настоящее время отсутствуют противостафилококковые препараты, эффективность которых была бы установлена в завершенных клинических испытаниях. Цель работы: получение секретлируемых белоксодержащих соединений *S. aureus* № 6 и изучение их иммуногенных свойств.

Материалы и методы. Секретлируемые белоксодержащие соединения (БСС) получали: «исходное» – из фильтратов культуральной жидкости *S. aureus* № 6, выращенных до конца фазы экспоненциального роста в соответствии с описанной ранее технологией I БСС и II БСС – после ионообменной хроматографии «исходного» БСС на колонках соответственно Q-Sepharose и DEAE-Sepharose. Накопление специфических IgG в сыворотках крови иммунизированных кроликов и мышей изучали в ИФА, иммуногенную активность – в опытах активной и пассивной защиты мышей линии BALB/c, по обсемененности органов и анализу формирования абсцессов в почках. Результаты. Изученные БСС обладали антигенной активностью (повышение в 2,2 – 7,5 раза уровня специфических IgG в сыворотках иммунизированных животных по сравнению с контролем), что свидетельствует об стимуляции системы адаптивного иммунитета и о существенной протективной активности: в опытах по активной (индекс эффективности 2,63 – 4,28) и пассивной защите. Иммунизация мышей «исходным» и II БСС значительно снижала высеваемость *S. aureus* из тканей почек мышей и формирование абсцессов в почках. Это свидетельствует о влиянии изучаемых БСС на тяжесть течения стафилококковой инфекции и позволяет предположить их терапевтическое действие.

Заключение. Проведенный комплексный анализ выявил перспективность дальнейшего изучения «исходного» и II белоксодержащих соединений, имеющих высокий протективный потенциал в доклинических исследованиях, в качестве кандидатов на включение в состав препарата для иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекций, вызываемых *S. aureus*.

Ключевые слова: белоксодержащие соединения, секретлируемые *S. aureus*, антитело, протективные свойства, высеваемость из почки, абсцессы в почках.

Immunogenic Activity of Secreted Protein-Based Compounds *Staphylococcus aureus* № 6

I.M. Gruber¹ (igruber_instmech@mail.ru), E.A. Astashkina¹ (selena7-87@rambler.ru), O.V. Lebedinskaya² (lebedinska@mail.ru), N.B. Egorova¹, M.V. Kiselevsky³ (kisele@inbox.ru), F.V. Donenko³ (f20005@list.ru), N.E. Yastrebova¹, O.M. Ignatova¹, E.A. Kurbatova¹, L.S. Cherkasova¹

¹Federal State Budgetary Research Institution «I.I. Mechnikov Scientific Research Institute for Vaccine and Sera» Moscow

²State Budgetary Educational Institution of Additional Professional Education «E.A. Vagner Permskaya State Medical University» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation

³Federal State Budgetary Research Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» Moscow

Abstract

Difficulties in the therapy of infection, caused by *S. aureus*, depends on the resistance of staphylococci to antibiotics, proceeding to chronicity of the diseases and the development on that background the depression of innate immunity functions and decreasing of the host resistance to the infection. In spite of tremendous efforts of researchers, up to date there are no commercial antistaphylococcal vaccine the efficacy of which would be proved in the completed clinical trials.

Aim: obtaining secreted protein-based substances of the *S. aureus* № 6 and investigation their immunogenicity.

Material and methods. Secreted protein-based substances (SPS) were obtain as: «initial» – from the filtrates of the culture fluid of the *S. aureus* № 6, grown to the end of the exponential phase according to the technology described previously [9], and I SPS and II

SPS – after the ion-exchange chromatography of the «initial» SPS on the columns with Q-Sepharose and DEAE-Sepharose. The level of specific IgG antibodies in sera of immunized rabbits and mice determined in ELISA, the immunogenic activity evaluated in experiments of active and passive protection from the challenge performed on BALB/c mice and also by the determination of the bacterial content in organs and in the test of abscesses formation in kidneys. Results. Investigated SBS possessed the antigenic activity (the level of specific IgG antibodies in sera of immunized animals increased 2.2 – 7.5 times compared to the control groups), that is favor of the activation of the adaptive immunity system and significant protective activity revealed in experiments of active (index of efficacy 2.63 – 4.28) and passive protection. The immunization of mice with the «initial» and II SPS led to significant decrease of the number of colony-forming units of *S. aureus* and formation of abscesses in kidneys of mice. It is evidently, that investigated SPS, influence on the severity of staphylococcal infection and possesses the therapeutic effect.

Conclusion. The preformed complex analysis at the current stage allowed to reveal perspectives of the further study of «initial» and II SPS in pre-clinical trials, as candidates, possessing the high protective facilities, for including them in the drug composition for immune prophylaxis and immunotherapy of diseases, caused by *S. aureus*.

Key words: secreted protein-based substances of *S. aureus*, antibody, protective properties, colony-forming units in kidneys, kidney's abscess

Введение

В современной вакцинологии к приоритетным направлениям относится разработка новых эффективных препаратов для профилактики и лечения заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, часто являющимися причиной инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи [1]. Трудность терапии таких заболеваний, в частности вызываемых *S. aureus*, определяется значительной резистентностью возбудителя к применяемым антибиотикам, хроническим характером течения болезни, а также развитием на ее фоне снижения уровня врожденного иммунитета и, соответственно, резистентности организма к инфекции. Вторичные иммунодефицитные состояния являются тем механизмом, который приводит к затяжному течению, частым рецидивам и осложнениям [2, 3].

Несмотря на то, что в настоящее время отсутствуют противостафилококковые препараты, подтвердившие свою эффективность в завершенных клинических испытаниях, есть исследования, которые показывают перспективность ряда препаратов. Положительные результаты получены также в исследованиях фирмы Inhibitex по созданию терапевтических антител [4 – 6]. Вместе с тем в современной стратегии разработки иммунопрофилактических и иммунотерапевтических препаратов против инфекций, вызываемых *S. aureus*, первоочередное значение имеет систематическая селекция антигенов, способствующая выбору тех из них, которые имеют наиболее высокий протективный вакцинный потенциал в доклинических исследованиях.

Традиционно в качестве протективных использовались поверхностные антигены микроорганизмов, тогда как данные свойства у секретируемых микробной клеткой белоксодержащих соединений (за исключением токсинов) изучены недостаточно. До настоящего времени только при разработке противостафилококковой вакцины Merck V710 проводилась специфическая селекция поверхностных белковых антигенов для выбора лучших из них, участвующих, в частности, в патогенезе инфекции [4]. Однако были опубликованы сведения

о том, что 2-я фаза клинических испытаний этого препарата, содержащего поверхностный железо-регулируемый белок IsdB, приостановлена [5].

Ранее в НИИВС им. И.И. Мечникова было показано, что при культивировании *Klebsiella pneumoniae* K2 на ранней стадии роста (экспоненциальная фаза) в культуральную среду выделяются белоксодержащие соединения (БСС), в том числе с молекулярной массой от 30 до 50 кДа. Они обладали протективными свойствами при заражении гомологичным K-типом возбудителя. Было также показано, что выделяемые при культивировании *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3 (№ 3) БСС с молекулярной массой 30 – 50 кДа обладают более высокой протективной активностью по сравнению с БСС, имеющими молекулярную массу 10 – 30 и более 50 кДа [7]. Полученные данные явились основанием для изучения белоксодержащих соединений, секретируемых *S. aureus*.

В ранее проведенных исследованиях был выбран штамм-продуцент, установлены его основные иммунобиологические свойства (генетическая характеристика, протеомный состав выделенных БСС) [8, 9] и показан более высокий уровень протективных свойств БСС, секретируемых высоковирулентным штаммом *S. aureus* № 6 [10]. Данные результаты в сочетании с более ранними в отношении БСС *K. pneumoniae* и *S. pneumoniae* [6] позволяют предположить, что для получения секретируемых белоксодержащих соединений целесообразно использовать наиболее вирулентные штаммы. В то же время для препаратов из поверхностных компонентов стафилококка (вакцины Иммуовак – ВП-4® и Стафиловак) ранее была показана необходимость в использовании наиболее иммуногенных и слабовирулентных штаммов [6, 11, 12].

Цель работы – получить секретируемые белоксодержащие соединения *S. aureus* № 6 и изучить их иммуногенные свойства.

Материалы и методы

Белоксодержащие соединения (БСС) штамма *S. aureus* № 6 (из коллекции ГИСК № 201200) полу-

чали из фильтрата культуральной жидкости после выращивания в жидкой синтетической питательной среде на основе среды Ледерберга [13] с добавлением 2 г/л «Экстракта дрожжевого растворимого» («Биотехновация», Москва) и 2 г/л глюкозы в течение 5 часов (до окончания фазы экспоненциального роста) в соответствии с технологией, описанной ранее [9]. Выделенное таким образом белоксодержащее соединение (БСС) обозначено как «исходное» БСС, фракционировано в дальнейшем с помощью ионообменной хроматографии:

- 1 фракцию (I БСС) получали на колонке Q-Sepharose, предварительно уравновешенной 0,15 M NaCl, и элюировали 1,5 M NaCl;
- 2 фракцию (II БСС) получали на колонке с ионообменным носителем DEAE-Sepharose, предварительно уравновешенной 50 мМ цитратным буфером, и элюировали 0,1 M цитратным буфером.

Фракционирование по молекулярной массе проводили с помощью ультрафильтрации на двух фильтрах с порогом отсечения белка ниже 30 кДа и выше 100 кДа.

Выделенные БСС характеризовали по содержанию в них белка, углеводов и нуклеиновых кислот [14 – 16]. Во всех проведенных исследованиях БСС стандартизовали по содержанию белка.

В работе были использованы мыши линии BALB с массой 12 – 14 г (самцы), из питомника филиала Научного центра биомедицинских технологий (Андреевка), содержащиеся в условиях вивария НИИВС им. И.И. Мечникова. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Накопление специфических IgG в сыворотках крови иммунизированных кроликов и мышей (средние данные, полученные соответственно от 3 кроликов и 6 мышей) определяли с использованием непрямого твердофазного метода иммуноферментного анализа с адсорбцией антигена («исходное» БСС) на носителе (полистирольные планшеты ВНИИ Медполимер, Москва) [17]. Сыворотки изучали в подобранных условиях ИФА: сорбция антигенного препарата в дозе 10 мкг белка/мл; использовался антивидовой конъюгат – антитела диагностические против IgG кролика или мыши, меченные пероксидазой (ООО «Медгамал», НИИЭИМ им. Н.Ф. Гамалеи), в разведении 1:3000; исходное разведение сыворотки в 100 раз. Учет проводили на планшетном фотометре Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, США) при 450 нм по оптической плотности иммунных сывороток с вычетом фона (ОПим-ф). За титр сыворотки принимали то разведение сыворотки, при котором ОПим-ф, равно или больше 0,2.

Исследование протективной активности БСС проводили в четырех вариантах экспериментов на мышах: изучение выживаемости вакцинирован-

ных мышей при заражении их летальными дозами *S. aureus*; изучение защитной активности сывороток иммунизированных мышей и кроликов; изучение обсемененности органов и анализ формирования абсцессов почки иммунизированных мышей, зараженных сублетальной дозой *S. aureus*.

В экспериментах активной защиты мышей иммунизировали подкожно (п/к) двукратно с интервалом 14 дней в объеме 0,1 мл разными дозами БСС с добавлением 2% гидроксида алюминия (SERVA, Гейдельберг, Германия) до конечной концентрации 0,02%. Заражение мышей штаммом *S. aureus* № 6 проводили ретроорбитально (р/о) (в ретроорбитальный синус, способ близок внутривенному) через 14 дней после последней иммунизации тремя пятикратно убывающими дозами (0,4 – 2,0 – 10,0 × 10⁸) микробных клеток. Группам интактных мышей (той же партии, по 10 особей на дозу) в предварительных экспериментах и одновременно с разрешающим заражением иммунизированных мышей вводили р/о три пятикратно убывающие дозы того же штамма. В течение 10 суток по отношению числа павших мышей к зараженным определяли LD₅₀ в каждой группе [18] и индекс эффективности – ИЭ (отношение LD₅₀ иммунизированных мышей к LD₅₀ неиммунизированным).

В экспериментах пассивной защиты мышей использовали кроличьи и мышинные сыворотки иммунных и интактных животных, разведенные в 5 раз, которые вводили мышам внутрибрюшинно (в/бр) по 0,5 мл, контрольным интактным животным – в/бр 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Через 2 часа после введения сывороток и натрия хлорида животных заражали в/бр *S. aureus* № 6 (2,5 × 10⁷ микробных клеток) в 0,4% «голодном» агаре. Учет выживаемости мышей проводили в течение 7 суток и сравнивали различия в выживаемости животных во всех группах.

Высеваемость из органов мышей, зараженных *S. aureus*, изучали на отработанной модели развития генерализованной инфекции, заключающейся в р/о заражении мышей сублетальной дозой, равной 0,1 LD₅₀ и (как определено в предварительных экспериментах) составляющей для *S. aureus* № 6 2 × 10⁷ микробных клеток, которую вводили р/о в 0,1 мл. На 1-е, 4-е, 7-е и 9-е сутки мышей выводили из опыта под эфирным наркозом. Высевы проводили в соответствии с [19].

Для проведения морфологических исследований использовали правую почку экспериментальных животных. Серийные парафиновые срезы (с промежутком 200 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином. При помощи микроскопа AxioPlan 2 с цифровой системой регистрации и анализа изображения Axio Vision 4.2 (Carl Zeiss, Германия) были сделаны фотографии срезов, на которых проводили морфометрический анализ образовавшихся абсцессов. С этой целью каждый препарат изучали в 4 полях зрения в каждом из 5 последовательных серийных срезов (всего 20 полей зрения).

Измерения проводили с использованием программы Image J при увеличении в 100 раз (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). В каждом исследовании учитывали число выявленных абсцессов в 1 и 20 (суммарно) полях зрения; площади поля зрения и абсцесса, в том числе суммарную площадь выявленных абсцессов во всех полях зрения (мкм²). Рассчитывали также процент площади почки, поврежденной абсцессами, и процент полей зрения, в которых отмечены абсцессы, от общего количества изученных полей зрения.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета статистических программ Excel (Windows 2003), BioStat D и Statistica 8.0 с применением параметрических и непараметрических методов сравнения. Достоверность различий между средними показателями рассматривалась при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Получение внеклеточных белоксодержащих соединений *S. aureus* № 6 и их анализ

При фракционировании «исходного» белоксодержащего соединения выделено 2 БСС: I БСС получено на колонке Q-Sepharose, II БСС – на DEAE-Sepharose. В таблице 1 приведены средние данные по химическому составу полученных белоксодержащих соединений (средние данные по 3 сериям).

Для изучения антигенной активности выделенных БСС были взяты сыворотки по разработанной схеме. Кроличьи сыворотки получали по трехкурсовой схеме иммунизации БСС: два курса двукратных подкожных введений и один курс двукратных внутривенных иммунизаций (по 3 кролика на препарат, интервал между иммунизациями – 2 недели, между курсами – 1,5 месяца). Суммарная иммунизирующая доза для «исходного» БСС – 480 мкг белка, в работах других исследователей при получении сывороток к секретиремым белкам *S. aureus* (коагулазе, железорегулируемому белкам, хлопьеобразующему фактору и фибронектин-связывающему белку) она составляла 1500 мкг [20 – 22]. При иммунизации I и II БСС были использованы существенно меньшие иммунизирующие дозы: суммарно соответственно 61 и 18 мкг, что было обосновано результатами предварительных экспериментов (для достижения защитного эффекта потребовались более низкие защитные дозы I и II БСС по сравнению с «исходным» БСС). Накопление

специфических IgG в ИФА в сыворотках иммунизированных кроликов свидетельствует о высокой антигенной активности БСС, особенно «исходного» и I БСС (табл. 2). Слабая антигенная активность кроличьих сывороток к II БСС, вероятно, объясняется низкими иммунизирующими дозами. Для получения мышиных сывороток животных иммунизировали двукратно в суммарных дозах 4,0 – 12,0 мкг белка (см. табл. 2). Для всех иммунизирующих препаратов определены значимые отличия результатов от контрольных (до иммунизации), что свидетельствует о накоплении специфических IgG в ИФА в сыворотках иммунизированных мышей.

Полученные результаты по накоплению специфических IgG в сыворотках кроликов и мышей после иммунизации изучаемыми БСС показали их высокую антигенную активность, причем наиболее высокую, особенно при иммунизации кроликов, «исходным» и I БСС, что, очевидно, связано с большими иммунизирующими дозами.

Протективная активность БСС

в опытах активной и пассивной защиты мышей

При анализе протективной активности БСС в зависимости от иммунизирующих доз «исходного» БСС выявлены значимые различия результатов с контролем при дозах 3,0 и 12,0 мкг, в то время как введение 0,75 мкг оказалось недостаточным для получения защитного эффекта у мышей (табл. 3, опыт 1).

Для сравнительного изучения протективной активности «исходного» БСС и выделенных из него фракций (I и II БСС) мышей иммунизировали следующими дозами соединений:

- «исходным» – 3,0 мкг (в 1 опыте эта доза защитила мышей);
- I и II БСС – 1,2 мкг (в предварительных экспериментах эта доза защитила мышей).

Сравнение протективной активности трех БСС (см. табл. 3) с контролем выявили значимые различия, что отмечено как в опыте 2 (при сравнительном изучении действия всех трех БСС), так и при исследовании I и II БСС в опытах 3 и 4. Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о протективных свойствах изученных БСС в опытах по активной защите мышей при иммунизации их в дозах: «исходного» – 3,0 мкг, I и II – по 1,2 мкг.

Таблица 1.
Химический состав выделенных БСС

БСС	Содержание, мкг/мл ($\bar{X} \pm m$)		
	белка	углеводов	нуклеиновых кислот
«Исходное»	986,7 ± 220,3	310,0 ± 48,2	212,0 ± 38,7
I	123,7 ± 35,1	38,4 ± 14,5	27,1 ± 6,4
II	31,2 ± 18,1	9,5 ± 3,1	7,0 ± 2,5

Таблица 2.
Уровень специфических IgG в сыворотках кроликов и мышей, иммунизированных БСС

Иммунизация		Характеристика сывороток в ИФА			
животных	БСС (ПАФ или ГОА) - суммарная доза (мкг)	ОП _{им-фон} (X ± m)		Титр*	
		иммунных	до иммунизации	иммунных	до иммунизации
Кролики	«Исходное» (ПАФ) - 480	1,99 ± 0,36**	0,25 ± 0,1	1:6400	1:200
	I (ПАФ) – 61	2,20 ± 0,16**	0,27 ± 0,15	1:6400 – 12800	1:200 – 1:400
	II (ПАФ) – 18	0,58 ± 0,03***	0,39 ± 0,01	1:200 – 400	1: 100
Мыши	«Исходное» (ГОА) – 12	0,65 ± 0,13**	0,13 ± 0,07		
	I (ГОА) – 4	0,44 ± 0,1**			
	II (ГОА) – 4	0,33 ± 0,1***			

Примечание: *сорбция БСС на полном адьюванте Фрейнда (ПАФ) или геле гидроокиси алюминия (ГОА); * ОП_{им-фон} ~ 0,2;
**p < 0,001,
***p < 0,005 – начимость различий с контролем (до иммунизации) по критерию Стьюдента.

Таблица 3.
Протективная активность БСС после р/о заражения иммунизированных мышей

№ опыта	Иммунизирующее БСС, мкг	Отношение числа павших мышей к зараженным: дозы м.к. x 10 ⁸			LD ₅₀ x 10 ⁸	По сравнению с контролем		ИЭ
		0,4	2,0	10,0		2*	p	
1	«Исходное», 0,75	1/10	6/10	10/10	1,45	0,37	>0,05	1,38
	«Исходное», 3,0	1/20	5/20	20/20	2,76	4,82	<0,05	2,63
	«Исходное», 12,0	1/20	6/20	13/20	4,47	10,81	<0,01	4,26
	Контроль	8/20	11/20	19/20	1,05			
2	«Исходное», 3, 0	0/10	2/10	10/10	3,24	4,29	<0,05	3,64
	I, 1, 2	0/10	3/10	9/10	3,24	4,29	<0,05	3,64
	II, 1, 2	0/10	2/10	9/10	3,81	5,41	<0,05	4,28
	Контроль	4/10	6/10	10/10	0,89			
3	I, 1, 2	1/10	1/10	9/10	3,81	4,27	<0,05	3,63
	Контроль	3/10	6/10	10/10	1,05			
4	II, 1, 2	0/10	1/10	7/10	6,17	5,55	<0,05	4,26
	Контроль	2/10	5/10	10/10	1,45			

Примечание: *2 рассчитан по числу мышей, павших от всех заражающих доз.

При изучении протективной активности БСС в опытах пассивной защиты мышей установлено, что выживаемость зараженных мышей, которым вводили мышинные и кроличьи сыворотки животных, иммунизированных изучаемыми БСС, была значимо выше по сравнению с контролем (табл. 4), что свидетельствует о протективных свойствах иммунных сывороток. В то же время сыворотки интактных мышей и кроликов не обладали защитным действием.

Таким образом, изучаемые БСС – «исходное» и выделенные из него I и II – обладают протективным действием, выявленным в экспериментах активной и пассивной защиты мышей.

Влияние БСС на высеваемость *S. aureus* из органов мышей и формирование абсцессов в почках

Результаты изучения высеваемости *S. aureus* из селезенки и почек представлены по:

- отношению количества мышей, у которых высевався золотистый стафилококк, к числу зараженных животных;
- количественному содержанию *S. aureus* в органах зараженных мышей, выраженному в Ig КОЕ/г.

Как и в предыдущих исследованиях [19], через сутки после заражения из селезенки иммунизи-

Таблица 4.
Протективная активность иммунных сывороток кроликов и мышей

Сыворотки иммунизированных животных	Иммунизирующее БСС для получения сывороток	Отношение числа павших мышей к зараженным	Различия с контролем	
			z	p
Мышиные	«Исходный»	3/10	7,50	< 0,001
	I	3/10	7,50	< 0,001
	II	3/10	7,50	< 0,001
	Сыворотка интактных мышей	6/10	2,40	> 0,05
	Контроль	9/10		
Кролички	«Исходный»	3/10	7,50	< 0,001
	I	5/10	3,81	0,05
	Сыворотка интактных кроликов	6/10	2,40	> 0,05
	Контроль	9/10		

ванных и контрольных мышей высевался *S. aureus*. Через 4 суток после заражения *S. aureus* высевался у 22,3% мышей, иммунизированных 3,0 мкг «исходного» БСС, и у 42,9% – контрольных ($p > 0,05$). У мышей, иммунизированных 12,0 мкг «исходного» БСС ($p < 0,05$), *S. aureus* не обнаруживался. Следует подчеркнуть, что через 7 суток после заражения из селезенки мышей практически не высеивается *S. aureus* ни в одной группе иммунизированных (за исключением 1 мыши, иммунизированной I БСС) и контрольных мышей.

Изучение высеваемости *S. aureus* из почки иммунизированных и контрольных мышей выявило значимое снижение количества животных с высевами через 4 и 7 суток после заражения при иммунизации «исходным» БСС ($p < 0,05$); число КОЕ существенно ниже по сравнению с контролем через 7 суток при дозе 3,0 мкг «исходного» (lg КОЕ/г соответственно $4,665 \pm 2,03$ и $7,0 \pm 0,001$, $p = 0,01$) и через 9 суток при дозе 1,2 мкг II БСС ($6,525 \pm 0,048$ и $7,6 \pm 0,2$, $p = 0,002$). В то же время при иммунизации I БСС по сравнению с контролем не выявлено значимое снижение высеваемости *S. aureus* через 9 суток после заражения (соответственно $6,957 \pm 1,77$ и $7,6 \pm 0,2$, $p > 0,05$).

Таким образом, иммунизация «исходным» и II БСС снижает высеваемость *S. aureus* из селезенки и почек мышей после их заражения по сравнению с контролем (неиммунизированными животными).

В исследованиях по конструированию стафилококковых вакцин для определения протективных антигенов ряд авторов, изучавших влияние различных поверхностных железорегулируемых белков и коагулазы, показали целесообразность использования «почечной модели», которая основана на изучении формирования абсцессов почки [21, 22].

Учитывая протективные свойства выделенных БСС и их влияние на высеваемость *S. aureus* из почки, в наших исследованиях была применена

«почечная модель». Было изучено формирование абсцессов в почках 36 (иммунизированных и контрольных) мышей, суммарно в 720 полях зрения. Установлено (с использованием непараметрического критерия согласия Пирсона – χ^2), что у мышей, иммунизированных «исходным» (дозы 1,8 и 3,0 мкг) и II БСС (доза 1,2 мкг), наблюдается и минимальное количество выявленных абсцессов, и значимо меньший процент полей зрения, в которых выявлены абсцессы, по отношению к общему количеству изученных полей зрения (от 1,7 до 3,75) по сравнению с контролем (15,7) (табл. 5). Это согласуется с результатами снижения высеваемости *S. aureus* из почек через 7 – 9 суток после заражения. Следует отметить, что у мышей, иммунизированных I БСС, выявлено большое количество абсцессов (56), а процент полей зрения с абсцессами составляет 28,75, что значимо выше, чем в контроле. В этом случае, как отмечено выше, не наблюдается снижения высеваемости *S. aureus* из почек через 9 суток после заражения.

Поскольку при подсчете количества абсцессов (А) в полях зрения серийных срезов нет возможности определить расположен ли измеряемый абсцесс в одном поле зрения или в нескольких, в исследовании использован дополнительный показатель – подсчет процента площади почки, занимаемой (поврежденной) абсцессами. При иммунизации 1,8 и 3,0 мкг «исходного» и 1,2 мкг II БСС установлены наименьшие значения этого параметра (0,05 – 0,37 %). Это согласуется с данными по снижению количества абсцессов и процента полей зрения с абсцессами у животных, иммунизированных II БСС. В то же время при иммунизации I БСС и в контроле площадь почки с абсцессами составляла соответственно 5,32 и 1,09%.

Результаты проведенного анализа с использованием параметров процента площади почки, поврежденной абсцессами, и процента полей зрения

Таблица 5.
Влияние различных БСС на формирование абсцессов (А) в почках мышей, зараженных р/о *S. aureus* № 6

БСС, доза, мкг		Количество			% полей зрения с А	Площадь x 10 ⁴ (мкм ²)		% площади полей зрения с А
		выявленных А	полей зрения с А	изученных полей зрения		суммарная А	изученных полей зрения	
«Исходное»	1,8	5	3	80	3,75*	41,52	11300	0,37
	3,0	1	1	60	1,7**	7,73	8475	0,09
I	1,2	56	23	80	28,75*	601,45	11300	5,32
II	1,2	10	4	200	2,0***	16,67	34274	0,05
Контроль	-	86	47	300	15,7	564,55	52013	1,09

Примечание: по 2 различия с контролем: *2 = 7,85, p = 0,005; ** 2 = 8,48, p = 0,004; *** 2 = 24,47, p < 0,001.

с абсцессами согласуются с результатами высеваемости из почки *S. aureus* у иммунизированных и контрольных мышей. Эти данные подтверждают протективное влияние иммунизации «исходным» (1,8 и 3,0 мкг) и II (1,2 мкг) белоксодержащими соединениями на тяжесть течения стафилококковой инфекции, что позволяет предположить терапевтическое действие изученных БСС.

Таким образом, в данном исследовании определены иммуногенные свойства разрабатываемых препаратов – секретиромых белоксодержащих соединений: «исходного» (выделяемого из фильтратов культуральной жидкости *S. aureus* № 6, выращенного до конца фазы экспоненциального роста) и двух – I БСС и II БСС, полученных после фракционирования «исходного» БСС, а также показано их влияние на тяжесть течения стафилококковой инфекции у мышей.

Повышение уровня специфических IgG в сыворотках животных, иммунизированных тремя изученными препаратами, и их существенная протективная активность в опытах активной и пассивной защиты мышей свидетельствуют об активации системы адаптивного иммунитета под действием всех исследованных БСС. В других тестах были выявлены некоторые отличия в действии I БСС и II БСС. Иммунизация «исходным» и II БСС значительно снижала высеваемость *S. aureus* из почек мышей, а также формирование абсцессов в почках, чего не наблюдали при иммунизации I БСС.

Приведенные сравнительные данные свидетельствуют об адекватности «почечной модели» и целесообразности использования предложенных показателей (определение процента площади поч-

ки, поврежденной абсцессами, и процента полей зрения с абсцессами) наряду с изучением антигенной и иммуногенной активности секретиромых стафилококковых белоксодержащих соединений. Результаты двух подходов показывают перспективность дальнейшего изучения «исходного» и II БСС в качестве кандидатов для включения в состав препаратов для иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекций, вызываемых *S. aureus*.

Выводы

1. Изучение секретиромых белоксодержащих соединений *S. aureus* № 6 – «исходного» и полученных после его фракционирования I БСС и II БСС – показало, что они обладают антигенным действием (повышение в 2,2 – 7,5 раза уровня специфических IgG в сыворотках иммунизированных кроликов и мышей по сравнению с контролем), что свидетельствует об активации системы адаптивного иммунитета.
2. Выявлено дозозависимое защитное действие «исходного» и I БСС, II БСС (индекс эффективности 2,63 – 4,28). Значимое протективное действие показано также в опытах пассивной защиты мышей при введении сывороток, полученных после иммунизации тремя исследуемыми препаратами.
3. Установлено, что иммунизация «исходным» и II БСС значительно уменьшала обсемененность *S. aureus* почек мышей, а также формирование абсцессов в почках, что позволяет предположить возможность терапевтического действия изучаемых белоксодержащих соединений.

Литература

1. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В. и др. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2011; 1: 4 – 7.
2. Семенов Б.Ф. Терапевтические вакцины. Российские медицинские вести. 2000; 5 (3): 26 – 32.
3. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение. Иммунология. 2003; 4: 196 – 203.
4. Otto M. Novel targeted immunotherapy approaches for staphylococcal infection. Expert Opin Biol Ther. 2010 July; 10 (7): 1049 – 1059. Doi:10.1517/14712598.2010.495115.
5. Грубер И.М., Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Михайлова Н.А. Стратегия разработки противостафилококковых иммунопрофилактических и иммунотерапевтических препаратов. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2013; 4: .31 – 38.

6. Егорова Н.Б., Ефремова В.Н., Курбатова Е.А., Грубер И.М. Экспериментальная и клинико-иммунологическая оценка бесклеточной стафилококковой вакцины «Стафиловак». Журн. микробиологии. 2008; 6: 102 – 108.
7. Тришин А.В., Доненко Ф.В., Курбатова Е.А., Воюшин К.Е., Киселевский М.В., Егорова Н.Б. и др. Протективная активность секретируемых белков *Streptococcus pneumoniae* и *Klebsiella pneumoniae*. Журн. микробиологии. 2008; 4: 46 – 50.
8. Борисова О.Ю., Грубер И.М., Егорова Н.Б., Игнатова О.М., Асташкина Е.А. Генетическая характеристика штамма *Staphylococcus aureus* № 6 – продуцента секретируемых белоксодержащих соединений, обладающих протективными свойствами. Журн. микробиологии. 2014; 6: 43 – 48.
9. Грубер И.М., Доненко Ф.В., Игнатова О.М., Асташкина Е.А., Зиганшин Р.К., Зарядьева Е.А. и др. Анализ внеклеточного протеома *Staphylococcus aureus* № 6 в конце фазы экспоненциального роста. Журн. микробиологии. 2013; 3: 3 – 12.
10. Грубер И.М., Доненко Ф.В., Асташкина Е.А., Игнатова О.М., Егорова Н.Б., Ванеева Н.П. и др. Способ получения протективной белоксодержащей фракции бактерий. Патент РФ, № 2533815; 2014.
11. Корзая Л.И. Исследование иммунологических свойств комплекса водорастворимых антигенов, полученного из разных штаммов стафилококка: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва; 1982.
12. Егорова Н.Б., Семенов Б.Ф., Курбатова Е.А., Ефремова В.Н., Каверина К.Г., Михайлова Н.А. Поликомпонентная вакцина для иммунопрофилактики и иммунотерапии заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами. Патент РФ, № 2209081; 2003.
13. Lederberg J. The nutrition of Salmonella. Arch. Biochem. 1950; 13 (2): 287 – 290.
14. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analyt. Biochem. 1976; 72: 248 – 254.
15. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton Y.K., Reber P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 1956; 28: 350 – 356.
16. Wong K.H., Barrera O., Sutton A., May J., Hochstein D.H., Robbins J.D. Standardization and control of meningococcal vaccine, group A and group C polysaccharides. J. Biol. Standart. 1977; 5: 197 – 215.
17. Антитела. Методы. Кн. 2: Пер. с англ, ред. Д. Кэтти. Москва, Мир; 1991.
18. Лабинская А.С., Волина Е.Г., ред. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга I. Москва: БИНОМ; 2008.
19. Грубер И.М., Егорова Н.Б., Михайлова Н.А., Черкасова Л.С., Тарасова О.Е., Асташкина Е.А. и др. Исследование протективной активности стафилококковой вакцины «Стафиловак-2». Журн. микробиологии. 2014; 6: 54 – 58.
20. Arrecubieta C., Matsunaga I., Asai T., Naka Y., Deng M.C., Lowy F.D. Vaccination with clumping factor A and fibronectin binding protein A to prevent *Staphylococcus aureus* infection of an aortic patch in mice. J. Infect. Dis. 2008; 198: 571 – 575.
21. Cheng A.G., McAdow M., Kim H.K., Bae T., Missiakas D., Schneewind O. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. PLoS Pathog 6 (8): e1001036. Doi: 10.1371/journal.ppat.1001036.
22. Kim H.K., DeDent A, Cheng A.G., McAdow M., Bagnoli F., Missiakas D.M, Schneewind O. IsdA and IsdB antibodies protect mice against *Staphylococcus aureus* abscess formation and lethal challenge. Vaccine. 2010; 28: 6382 – 6392.

References

1. Pokrovsky V.I., Akimkin V.G., Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P. Kovalishena O.V. et al. Nosocomial infections: new horizons of the prophylaxis. Epidemiologia i Infektsionnye Bolesni. 2011; 1: 4 – 7 (in Russian).
2. Semenov B.F. Therapeutic vaccines. Rossiskiy Meditsinskiy Vestnik. 2000; 5 (3): 26 – 32 (in Russian).
3. Khaitov R.M., Pinegin B.V. Immunomodulators: mechanism of action and clinical usage. Immunologiya. 2003; 4: 196 – 203 (in Russian).
4. Otto M. Novel targeted immunotherapy approaches for *staphylococcal* infection. Expert Opin Biol Ther. 2010 July; 10 (7): 1049 – 1059. Doi: 10.1517/14712598.2010.495115.
5. Gruber I.M., Egorova N.B., Kurbatova E.A., Mikhailova N.A. Strategy for design of antistaphylococcal drugs for immunoprophylaxis and immunotherapy. Epidemiologia i Infektsionnye Bolesni. Aktualniye voprosi. 2013; 4: 31 – 38 (in Russian).
6. Egorova N.B., Efremova V.N., Kurbatova E.A., Gruber I.M. Experimental, clinical and immunologic assessment of acellular staphylococcal vaccine «Staphylovac». Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 6: 102 – 108 (in Russian).
7. Trishin A.V., Donenko F.V., Kurbatova E.A., Voyushin K.E., Kiselevsky M.V., Egorova N.B. et al. B.F. Protective activity of secreted proteins of *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae*. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 4: 46 – 50 (in Russian).
8. Borisova O.Yu., Gruber I.M., Egorova N.B., Ignatova O.M., Astashkina E.A. Genetic characteristics of *Staphylococcus aureus* № 6 strain — producer of secreted protein-containing compounds possessing protective properties. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2014; 6: 43 – 48 (in Russian).
9. Gruber I.M., Donenko F.V., Ignatova O.M., Astashkina E.A., Ziganshin R.K., Zaryadiyeva E.A., Semenova I.B., Kurbatova E.A., Cherkasova L.S., Tarasova O.E., Kiselevsky M.V. Analysis of extracellular proteome of *Staphylococcus aureus* 6 at the end of exponential growth phase. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2013; 3: 3 – 12 (in Russian).
10. Gruber I.M., Donenko F.V., Astashkina E.A., Ignatova O.M., Egorova N.B., Vaneeva N.P., et al. Method of producing protective protein-based fraction of bacteria. Patent Ru., № 2533815; 2014 (in Russian).
11. Korzaya L.I. The investigation of immunological properties of the complex of water-soluble antigens, obtained from different strains of *Staphylococcus*. Doctorate of med. sci. diss. Moscow; 1982 (in Russian).
12. Egorova N.B., Semenov B.F., Kurbatova E.A., Efremova V.N., Kaverina K.G., Mikhailova N.A. Polycomponent vaccine for immunoprophylaxis and immunotherapy of diseases, caused by opportunistic microorganisms. Patent Ru, № 2209081; 2003 (in Russian).
13. Lederberg J. The nutrition of Salmonella. Arch. Biochem. 1950; 13 (2): 287-290.
14. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analyt. Biochem. 1976; 72: 248 – 254.
15. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton Y.K., Reber P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 1956; 28: 350 – 356.
16. Wong K.H., Barrera O., Sutton A., May J., Hochstein D.H., Robbins J.D. Standardization and control of meningococcal vaccine, group A and group C polysaccharides. J. Biol. Standart. 1977; 5: 197 – 215.
17. Antitela. Metodi. Kniga. 2: Translation from English. Ed.: D. Ketty. Moscow: Mir; 1991.
18. Labinskaya A. S., Volina E. G., eds. Manual of medical microbiology. General and sanitary microbiology. Book I. Moscow: BINOM; 2008.
19. Gruber I.M., Egorova N.B., Mikhailova N.A., Cherkasova L.S., Tarasova O.E., Astashkina E.A., Ignatova O.M., Kurbatova E.A. Study of protective activity of «Staphylovac-2» vaccine. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2014; 6: 54 – 58.
20. Arrecubieta C., Matsunaga I., Asai T., Naka Y., Deng M.C., Lowy F.D. Vaccination with clumping factor A and fibronectin binding protein A to prevent *Staphylococcus aureus* infection of an aortic patch in mice. J. Infect. Dis. 2008; 198: 571 – 575.
21. Cheng A.G., McAdow M., Kim H.K., Bae T., Missiakas D., Schneewind O. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. PLoS Pathog 6(8): e1001036. Doi: 10.1371/journal.ppat.1001036.
22. Kim H.K., DeDent A, Cheng A.G, McAdow M., Bagnoli F., Missiakas D.M, Schneewind O. IsdA and IsdB antibodies protect mice against *Staphylococcus aureus* abscess formation and lethal challenge. Vaccine. 2010; 28: 6382 – 6392.