

ВАКЦИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

Д.С. Воробьев, И.Б. Семенова, Ю.В. Волох, А.В. Кудряшов, М.Е. Маркова, Э.Е. Романенко, А.П. Батуро, Н.А. Михайлова

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛОКСОДЕРЖАЩЕГО КОМПЛЕКСА АНТИГЕНОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* В ГОМОЛОГИЧНОЙ СИСТЕМЕ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Исследование протективной активности белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae*, полученного из штамма Т3№3 против заражения гомологичным штаммом пневмококка. **Материалы и методы.** В работе использован штамм *S. pneumoniae* Т3№3 (серотип 3), полученный из коллекции штаммов пневмококка НИИВС им. И.И. Мечникова. Белоксодержащий комплекс антигенов *S. pneumoniae* выделяли путем осаждения двукратным объемом ацетона надосадочной фракции культуральной среды, в которой выращивали пневмококк. Молекулярную массу белков, входящих в состав комплекса антигенов *S. pneumoniae*, определяли с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Протективную активность белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae* изучали в опытах активной защиты мышей линии BALB/c. Активность иммунных мышиных сывороток, полученных к цельноклеточной культуре пневмококка (штамм Т3№3), определяли *in vitro* с помощью твердофазного непрямого ИФА. **Результаты.** Полученные результаты свидетельствуют, что выделенный белоксодержащий комплекс антигенов *S. pneumoniae* из штамма Т3№3 эффективно защищает мышей от последующего заражения гомологичным штаммом *S. pneumoniae*. С помощью ИФА установлено, что белоксодержащий комплекс антигенов *S. pneumoniae*, сорбированный на твердой фазе в дозе 5 мкг/мл, взаимодействует с гомологичной иммунной сывороткой мышей. **Заключение.** Результаты проведенных экспериментов позволяют перейти к изучению перекрестной активности белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae*, выделенного из штамма Т3№3.

Журн. микробиол., 2013, № 1, С. 21—26

Ключевые слова: белоксодержащий комплекс антигенов *S. pneumoniae*, протективная активность

D.S. Vorobyev, I.B. Semenova, Yu.V. Volokh, A.V. Kudryashov, M.E. Markova, E.E. Romanenko, A.P. Baturo, N.A. Mikhaylova

STUDY OF PROTECTIVE ACTIVITY OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* PROTEIN-CONTAINING ANTIGEN COMPLEX IN HOMOLOGOUS SYSTEM

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Study protective activity of *S. pneumoniae* protein-containing antigen complex obtained from T3No.3 strain against infection by homologous pneumococcus strain. **Materials and methods.** *S. pneumoniae* T3No.3 (serotype 3) strain obtained from collection of pneumococcus strains of Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera was used in the study. *S. pneumoniae* protein-containing antigen complex was isolated by precipitation by 2 volumes of acetone of supernatant fraction of cultural medium used for pneumococcus cultivation. Molecular mass of proteins contained in *S. pneumoniae* antigen complex was determined by SDS electrophoresis in polyacrylamide gel. Protective activity of *S. pneumoniae* protein-containing antigen complex was studied in BALB/c line mice active protection experiments. Activity of mice immune sera obtained against whole-cell pneumococcus culture (T3No.3 strain) was determined *in vitro* by solid phase indirect EIA. **Results.** The data obtained give evidence that the isolated protein-containing antigen complex

from *S. pneumoniae* T3No.3 strain effectively protects mice from consequent infection by a homologous *S. pneumoniae* strain. *S. pneumoniae* protein-containing antigen complex sorbed on solid phase at 5 µg dose was established by using EIA to interact with homologous mice immune sera. *Conclusion.* The results of the carried out studies allow to move to studies of cross-activity of *S. pneumoniae* protein-containing antigen complex isolated from T3No.3 strain.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2013, No. 1, P. 21—26

Key words: *S. pneumoniae* protein-containing antigen complex, protective activity

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания, вызываемые *S. pneumoniae*, являются актуальной медико-социальной проблемой для всего мира. По данным ВОЗ ежегодно от пневмококковой инфекции погибают более 1 млн человек, причем 50% их них составляют дети в возрасте до 5 лет [1]. Для профилактики пневмококковых инфекций существуют зарубежные вакцины: полисахаридная «Пневмо-23» («Sanofi Pasteur», Франция) и конъюгированные с рекомбинантным белком CRM₁₉₇ дифтерийного анатоксина — «Превенар-7», «Превенар-13» («Wyeth», США) и «Синфлорикс» («Glaxo-SmithKline», Бельгия), которые позволяют создать защиту против большинства актуальных серотипов пневмококка [8]. Стоит заметить, что «Пневмо-23» не эффективна у детей младше 2 лет, так как она не вызывает Т-зависимого иммунного ответа, а также недостаточно эффективна у пожилых людей старше 65 лет с высоким риском развития пневмококковых заболеваний [17]. Конъюгированные пневмококковые вакцины способны защищать детей первых 5 лет жизни, так как белок-носитель вызывает формирование Т-клеточного ответа к конъюгированным полисахаридам [15, 17, 18]. Однако данный белок CRM₁₉₇ дифтерийного анатоксина не усиливает специфический ответ к пневмококку и не влияет на профилактику дифтерии. В связи с этим, актуальным представляется определение защитной роли белков пневмококка, так как последние обладают внутривидовой перекрестной активностью и, соответственно, могут быть использованы в вакцине против пневмококковой инфекции для усиления специфического иммунного ответа [3, 4, 10]. Кроме того, представляет не меньший интерес изучение активности

естественного комплекса белков и полисахаридного антигена *S. pneumoniae*.

Целью работы явилось исследование протективной активности белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae*, полученного из штамма T3№3 (серотип 3) против заражения гомологичным штаммом пневмококка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Настоящая работа проведена со штаммом *S. pneumoniae* T3№3 (серотип 3), обладающим высокой вирулентностью. Исследование выполнено в эксперименте *in vitro* и *in vivo*.

Штамм *S. pneumoniae* T3№3 получен из коллекции штаммов пневмококка НИИВС им. И.И.Мечникова. Культуру *S. pneumoniae* выращивали в сердечно-мозговом бульоне в течение 16 — 18 ч при температуре 37°C и 5% содержании углекислого газа в CO₂-инкубаторе.

Белоксодержащий комплекс антигенов *S. pneumoniae* выделяли путем осаждения двукратным объемом ацетона надосадочной фракции культуральной среды, в которой выращивали пневмококк. По химическому составу препарат содержал 8,0% белка, 6,0% углеводов и 3,9% нуклеиновых кислот.

Протективную активность полученного белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae* определяли в опытах активной защиты мышей. Опыты проводили на мышах линии BALB/c (самцы и самки) массой 14 — 16 г, полученные из Научного центра биомедицинских технологий (филиал «Андреевка»).

Мышам вводили внутрибрюшинно белоксодержащий комплекс антигенов *S. pneumoniae* двукратно в дозах 10 и 100 мкг/мышь или этот же комплекс антигенов *S. pneumoniae* в вышеназванных дозах, сорбированный на гидрооксиде алюминия, с интервалом 14 дней. Через

2 недели после повторного введения белоксодержащего комплекса мышей заражали внутрибрюшинно штаммом *S. pneumoniae* ТЗ№3 в дозе 10^5 м.к. в 0,5 мл 0,9% раствора NaCl. В качестве контроля служили интактные мыши или мыши, получавшие только гидрооксид алюминия. Наблюдение за животными проводили в течение 21 дня.

Для характеристики электрофоретической подвижности и определения молекулярной массы белковых компонентов комплекса антигенов *S. pneumoniae* использовали вертикальный SDS-электрофорез в ПААГ [11]. Электрофорез выполняли по общепринятому протоколу с использованием стандартного набора оборудования, выпускаемого фирмой Bio-Rad Laboratories Ltd., PowerPac™ Universal 100-120/220-240V, Protean II xi 2-D Cell/Protean II xi Slab Cell. Электрофорез комплекса антигенов *S. pneumoniae* проводили в 15% ПААГ. Для исследования использовали растворы белоксодержащего комплекса антигенов пневмококка и антигенов среды (для контроля), которую использовали для выращивания пневмококка, в концентрации 40 мг/мл. Перед нанесением в лунки пластины анализируемые образцы смешивали с лизирующим буфером (10 мл электродного буфера, 0,5 г SDS, 0,5 мл меркаптоэтанола, 100 мкл 1% бромфенолового синего) для разведения образцов в соотношении 1:1, а калибраторы молекулярных масс — в соотношении 1:7, и все пробы кипятили в течение 5 мин для демицеллирования. Объем образца, вносимого в лунку, составлял 60 мкл. Электрофорез проводили в трис-глициновом буферном растворе (рН=8,3) при 20 мА до вхождения образцов в разделяющий гель, а затем — при 40 мА. Опыт прекращали при подходе зоны красителя к нижнему краю геля. При исследовании белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae* по завершении электрофореза проводили следующие операции: фиксацию 15% раствором ТХУ (15 г ТХУ, 425 мл дистиллированной воды) — в течение 2 ч; окрашивание реактивом Coomassie R-250 (2 г Coomassie Brilliant Blue R-250, 200 мл 96% этанола, 200 мл дистиллированной воды)

— в течение 40 — 45 мин; отмывку (200 мл ледяной уксусной кислоты, 700 мл 96% этанола, 1100 мл дистиллированной воды).

Для получения иммунных сывороток к цельноклеточной культуре пневмококка мышам вводили живую культуру *S. pneumoniae* (штамм ТЗ№3) пятикратно внутрибрюшинно с интервалом 14 дней в дозах 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 и 10^6 м.к./0,5 мл. Через 2 недели после последней иммунизации у животных тотально забирали кровь. Активность полученных сывороток проверяли *in vitro* с помощью метода твердофазного непрямого ИФА, сыворотки титровали до разведения 1:6400 [9].

Результаты оценивали по выживаемости мышей, которую определяли в течение заданного срока по [5]. В каждой группе было 10 мышей. Достоверность разницы между выживаемостью животных опытной и контрольной групп определяли с помощью расчета критерия значимости в соответствии с [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В электрофорезе (рис.) в полиакриламидном геле с помощью белкового красителя Кумасси R-250 определяли молекулярную массу белков, входящих в состав полученного комплекса антигенов *S. pneumoniae* (штамм ТЗ№3). В результате выявили, что в состав исследуемого комплекса входят белоксодержащие антигены с молекулярной массой 72, 52, 45 и 32 кДа.

С помощью ИФА *in vitro* показано, что нативный белоксодержащий комплекс антигенов *S. pneumoniae*, полученный из штамма ТЗ№3, сорбированный на твердой фазе в дозе 5 мкг/мл, взаимодействует с гомологичной иммунной сывороткой мышей. Разница оптической плотности ($\Delta\text{ОП}_{450}$) между иммунной ($\text{ОП}_{450}=0,845$) и неиммунной ($\text{ОП}_{450}=0,38$) сыворотками составила 0,465 ($p<0,05$).

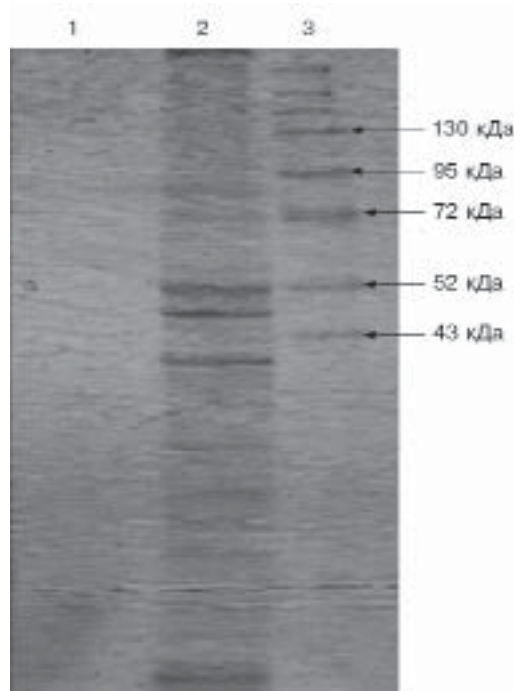
В первой серии экспериментов *in vivo* была изучена протективная активность белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae*, полученного из штамма ТЗ№3. В табл. приведены результаты опытов, в которых исследовали рези-

стентность мышей к заражению гомологичным штаммом пневмококка после двукратного введения белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae* или этого же комплекса антигенов *S. pneumoniae*, сорбированного на гидроксиде алюминия в дозах 10 и 100 мкг/мышь, а также самого гидроксида алюминия. В 1 опыте двукратное введение белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae* или этого же комплекса антигенов *S. pneumoniae*, сорбированного на гидроксиде алюминия, в вышеперечисленных дозах обеспечивало защиту животных на уровне 80, 90 и 100% соответственно ($p < 0,05$) от последующего заражения 8 LD₅₀ *S. pneumoniae* по сравнению с контролем. Введение одного гидроксида алюминия не вызывало формирование защиты от пневмококковой инфекции. Во 2 опыте двукратное введение белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae* защищало экспериментальных животных от последующего заражения 25 LD₅₀ гомологичного штамма *S. pneumo-*

pneumoniae при использовании дозы 10 мкг/мышь, но не 100 мкг/мышь (50% выживших животных против 10% в контроле, $p < 0,05$), в то время как введение белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae*, сорбированного на гидроксиде алюминия, обеспечивало защиту мышей как в дозе 10 мкг/мышь, так и в дозе 100 мкг/мышь (80 и 90% выживших животных соответственно, $p < 0,05$) по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом динамики появления коммерческих конъюгированных пневмококковых вакцин можно предположить, что вряд ли они будут длительное время оставаться эффективными, поскольку эпидемиологический процесс пневмококковой инфекции характеризуется постоянной сменой этиологически значимых серотипов [16]. По данным отечественных авторов, лидирующие штаммы пневмококка, вызывающие клинически значимые заболевания, претерпели некоторые изменения. Так, в настоящее время в число лидеров входят серотипы 6A/B, 19F, 23F, 15B/C, 10A, в то время как в 90-х годах XX века доминирующими серотипами являлись 2, 3 и 6 [2, 6, 7]. В зарубежной литературе на протяжении последних 10 — 15 лет активно обсуждается вопрос разработки вакцины на основе протективных белков пневмококка, поскольку последние обладают внутривидовой перекрестной активностью. Из целого ряда известных пневмококковых белков можно отметить несколько ключевых, на которых заострено внимание большинства исследователей. Это, прежде всего, пневмококковые поверхностные белки А и С (PspA и PspC), пневмококковый поверхностный антиген А (PsaA) и пневмолизин (Ply). В эксперименте продемонстрировано, что перечисленные белки способны защищать мышей от пневмококковой инфекции [12 — 14]. Более того, учитывая капсульную специфичность *S. pneumoniae*, можно предположить, что природный комплекс белков пневмококка вместе с несколькими капсульными полисахаридами (обладающими также частичной перекрестной активностью между



SDS-электрофорез в 15% ПААГ белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae* ТЗ№3 (2) и антигенов, полученных из среды, которую использовали для выращивания пневмококка (1); 3 — маркер молекулярного веса.

Выживаемость мышей при внутрибрюшинном введении белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae* ТЗ№3 против заражения гомологичным штаммом *S. pneumoniae*

№ опыта	№ группы	Название препарата для иммунизации	Доза, мкг/мышь	Заражающая доза <i>S. pneumoniae</i> в LD ₅₀	Выживаемость на 21 сутки	Критерий значимости, Z
1 (самки)	1	Белоксодержащий комплекс антигенов <i>S. pneumoniae</i>	10	8	9/10	3,54
	2	Белоксодержащий комплекс антигенов <i>S. pneumoniae</i>	100	—//—	8/10	3,17
	3	Белоксодержащий комплекс антигенов <i>S. pneumoniae</i> + Al(OH) ₃	10+200 Al(OH) ₃	—//—	10/10	3,9
	4	Белоксодержащий комплекс антигенов <i>S. pneumoniae</i> + Al(OH) ₃	100+500 Al(OH) ₃	—//—	10/10	3,9
	5	Al(OH) ₃	200	—//—	1/10	0,27
	6	Al(OH) ₃	500	—//—	1/10	0,3
	7	Контроль (интактные мыши)	—	—//—	1/10	—
2 (самцы)	1	Белоксодержащий комплекс антигенов <i>S. pneumoniae</i>	10	25	5/10	2,2
	2	Белоксодержащий комплекс антигенов <i>S. pneumoniae</i>	100	—//—	1/10	0,97
	3	Белоксодержащий комплекс антигенов <i>S. pneumoniae</i> + Al(OH) ₃	10+200 Al(OH) ₃	—//—	9/10	3,4
	4	Белоксодержащий комплекс антигенов <i>S. pneumoniae</i> + Al(OH) ₃	100 + 500 Al(OH) ₃	—//—	8/10	3,08
	5	Al(OH) ₃	200	—//—	0/6	0,41
	6	Al(OH) ₃	500	—//—	0/6	0,41
	7	Контроль (интактные мыши)	—	—//—	1/10	—

собой) будет способен создавать эффективную защиту как против гомологичного, так и гетерологичного заражения *S. pneumoniae*. Однако на сегодняшний день в мире не зарегистрировано ни одной коммерческой вакцины на основе белков и капсульных полисахаридов пневмококка.

Представленные данные являются первоначальным этапом работы по изучению протективных свойств белков пневмококка и свидетельствуют, что выделенный белоксодержащий комплекс антигенов *S. pneumoniae* из штамма ТЗ№3 эффективно защищает мышей от последующего заражения гомологичным штаммом *S. pneumoniae*. Установлено, чем выше применяемая летальная доза живой культуры, тем большее адъювантное значение для усиления иммунного ответа имеет гидроксид алюминия. Учитывая химический состав полученного комплекса и данные электрофореза, можно предположить, что выявленная защита формируется как за счет белкового, так и за счет полисахаридного компонента, иными словами, за счет естественного белково-полисахаридного комплекса (возможно, гликопротеина).

Полученные факты открывают перспективу дальнейшего изучения перекрестной активности вышеназванного белоксодержащего комплекса антигенов *S. pneumoniae*, полученного из штамма

ТЗ№3 или аналогичных белоксодержащих комплексов пневмококка, выделенных из других штаммов *S. pneumoniae*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брико Н.И. Распространенность и возможности профилактики пневмококковых инфекций в мире и в России. Вакцинация. 2009, 2 (58): 5-7.
2. Вишнякова Л.А., Резцова Ю.В., Сологуб Т.С. и др. Этиология острой пневмонии на фоне гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций. Журн. микробиол. 1986, 8: 5-10.
3. Воробьев Д.С., Семенова И.Б. Пневмококковый поверхностный белок А и новые подходы к разработке пневмококковых вакцин. Журн. микробиол. 2011, 6: 107-113.
4. Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Курбатова Е.А. Белки *Streptococcus pneumoniae*: перспективы создания вакцины против пневмококковой инфекции. Журн. микробиол. 2010, 6: 98-104.
5. Гланц С.А. Медико-биологическая статистика. М., Практика. 1999.
6. Гречуха Т.А. Обоснование, эффективность и безопасность вакцинации против пневмококковой инфекции детей с заболеваниями почек. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 2011.
7. Миронов К.О., Платонов А.Е., Козлов Р.С. Идентификация и серотипирование российских штаммов *Streptococcus pneumoniae* с применением методик, основанных на ПЦР. Клин. микробиол. анти-микроб. химиотер. 2011, 4 (13): 304-312.

- Харит С.М. Пневмококковые вакцины. В: В.В.Зверев, Б.Ф.Семенов, Р.М.Хаитов (ред.). Вакцины и вакцинация. М., ГЭОТАР-Медиа, 2011.
8. Ястребова Н.Е., Ванеева Н.П., Демин А.А. и др. Иммуноферментный анализ антител к нативной и денатурированной ДНК. Иммунология. 1987, 5: 73-75.
 9. Jedrzejak M.J. Pneumococcal virulence factors: structure and function. Microbiol. Molec. Boil. 2001, 65 (2): 187-207.
 10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature. 1970, 227: 680-685.
 11. Lu Y.J., Forte S., Thompson C.M. et al. Protection against Pneumococcal colonization and fatal pneumonia by a trivalent conjugate of a fusion protein with the cell wall polysaccharide. Infect. Immun. 2009, 77 (5): 2076-2083.
 12. Meng C., Lin H., Huang J. et al. Development of 5-valent conjugate pneumococcal protein A — Capsular polysaccharide pneumococcal vaccine against invasive pneumococcal disease. Microb. Pathog. 2009, 47 (3): 151-156.
 13. Ogunniyi A.D., Grabowicz M., Briles D.E. et al. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 2007, 75 (1): 350-357.
 14. Reinert R.R., Paradiso P., Fritzell B. Advances in pneumococcal vaccines: the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine received market authorization in Europe. Expert Rev. Vac. 2010, 9 (3): 229-236.
 15. Schenkein J.G., Nahm M.H., Dransfield M.T. Pneumococcal vaccination for patients with COPD: current practice and future directions. Chest. 2008, 133 (3): 767-774.
 16. Targonski P.V., Poland G.A. Pneumococcal vaccination in adults: recommendations, trends, and prospects. Cleve. Clin. J. Med. 2007, 74 (6): 401-414.
 17. Worldwide progress in introducing pneumococcal conjugate vaccine, 2000-2008. WHO Weekly Epidemiol. Rec. 2008, 83 (43): 388-392.

Поступила 19.06.12

Контактная информация: Воробьев Денис Сергеевич, к.м.н.,
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-57-74

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

Е.А.Курбатова, Д.С.Воробьев, Н.Б.Егорова, С.И.Елкина, Н.Г.Калина,
М.М.Токарская, А.П.Батуро, Э.Е.Романенко, М.Е.Маркова, Н.В.Грищенко,
Н.Н.Овечко, Ю.В.Волох, С.А.Злыгостев, Н.А.Михайлова

ВЛИЯНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА И СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПЕРЕКРЕСТНУЮ АНТИГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ ВОДОРАСТВОРИМЫХ АНТИГЕНОВ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Получение водорастворимых белоксодержащих антигенов из разных штаммов *S.pneumoniae* при культивировании на полноценной и полусинтетической питательных средах, а также выбор штаммов с перекрестной антигенной активностью. **Материалы и методы.** Для получения водорастворимых антигенов штаммы *S.pneumoniae* серотипов 3, 6А, 6В, 14, 10А, 18А, 19А, 19F, 23F культивировали на сердечно-мозговом бульоне и полусинтетической среде с добавлением аминокислоты в течение 24 ч при 37°C. Антигены получали методом 3-кратной водной экстракции из высушенных ацетоном микробных клеток. Исследовали химический состав препаратов, электрофоретическую подвижность белоксодержащих компонентов препаратов и перекрестную антигенную активность в реакции иммунодиффузии в геле при использовании гипериммунных кроличьих сывороток. **Результаты.** При исследовании 10 штаммов пневмококка различных серотипов выбран метод инактивации микробных клеток ацетоном, позволяющий получить препараты с высоким содержанием белка (25,5 — 53,1)%. Электрофоретическое разделение препаратов выявило различия в препаратах, полученных из разных штаммов пневмококка, в расположении мажорных белковых полос в диапазоне от 8 до 95 кДа. Выбран наиболее вирулентный и иммуногенный штамм *S.pneumoniae*, который при культивировании на полусинтетической среде характеризовался внутривидовой перекрестной антигенной