

2. Арзумян В.Г., Мальбахова Е.Т., Фошина Е.П., Артемьева Т.А., Бутовченко Л.М., Варганова Н.О., Шмелева О.А. Патент на изобретение № 2602298 от 21.10.2016 по заявке № 2015113069, приоритет 10.04.2015: Способ определения совокупной активности антимикробных пептидов как маркера состояния местного иммунитета различных эпителиальных тканей. Патентообладатель ФГБНУ НИИВС им. Мечникова.
3. Арзумян В.Г., Шмелева О.А. Клинически значимые дрожжевые грибы — классификация, антигены и современные методы диагностики. Микология сегодня. Ю.Т.Дьяков, А.Ю.Сергеев (ред.). М.: Национальная академия микологии. 2016, 3:116-139.
4. Поляков Е.Г., Дерябин Д.Г., Грищенко В.А. Патент на изобретение № 2247987 от 10.03.2005, приоритет 22.01.2003. Способ определения бактерицидной активности сыворотки крови. Патентообладатель ООО «Центр научного зондирования» (RU).
5. Arzumian V., Shmeleva O., Michailova N. Elevated Activity Levels of Serum Antimicrobial Peptides in Mice as Response to Immunization with Yeast Antigens. Med. Mycol. Open. Access. 2017, 3(1):23.
6. Guimarres L.L., Marcos S., Toledo M.S. et al. Structural diversity and biological significance of glycosphingolipids in pathogenic and opportunistic fungi Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014, 4:138-146.
7. Johansson B.G., Malmquist J. Quantitative Immunochemical Determination of Lysozyme (Muramidase) in Serum and Urine. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. 1971, 27(3):255-261.
8. Kavishwar Amol, Shukla P K. Candidacidal activity of a monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of *Candida albicans*. Medical Mycology. 2006, 44(2):159-167.
9. Magalhães G.M., Saut J.P., Beninati T. et al. Cerebral cryptococcomas in a cow. J. Comp. Pathol. 2012, 147(2-3):106-110.
10. Martin L., Koczera P., Simons N. et al. The Human Host Defense Ribonucleases 1, 3 and 7 Are Elevated in Patients with Sepsis after Major Surgery — A Pilot Study. Int. J. Mol. Sci. 2016, 17(3):294-305.
11. Ortega-Martínez I., Gardeazabal J., Erramuzpe A. et al. Vitronectin and dermcidin serum levels predict the metastatic progression of AJCC I—II early-stage melanoma. Int. J. Cancer. 2016, 139(7):1598-1607.
12. Salazar V.A., Arranz-Trullén J., Navarro S. et al. Secretory RNase 3 and RNase 7 against *Candida albicans*. Microbiology open. 2016, 5(5):830-845.
13. Sebaa S., Hizette N., Boucherit-Otmani Z. et al. Dose-dependent effect of lysozyme upon *Candida albicans* biofilm. Mol. Med. Rep. 2017, 15(3):1135-1142.
14. Wawron W., Bochniarz M., Piech T. Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 2010, 54:201-204.
15. Zasloff M. Antimicrobial Peptides in Health and Disease. The New England Journal of Medicine. 2002, 347(1):1199-1200.
16. Zeth K., Sancho-Vaello E. The Human Antimicrobial Peptides Dermcidin and LL-37 Show Novel Distinct Pathways in Membrane Interactions. Front. Chem. 2017, 5:86-92.
17. Zimmerman L.B., Worley B.V., Palermo E.F. et al. Absorbance-based assay for membrane disruption by antimicrobial peptides and synthetic copolymers using pyrroloquinoline quinone-loaded liposomes. Anal. Biochem. 2011, 411(2):194-199.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

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

## СВОЙСТВА НАТИВНЫХ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ АНТИГЕНОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

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

*Цель.* Исследование иммунохимических и иммунобиологических свойств нативных белок-содержащих антигенов пневмококка (*БсАП*). *Материалы и методы.* Штаммы *S. pneumoniae*, используемые в работе, получены из ЦКП коллекция НИИВС им. И.И. Мечникова. Изучали химический состав, молекулярную массу полученных антигенов в SDS-электрофорезе и титры антител к ним в иммуноферментном анализе (ИФА). Протективную активность БсАП определяли в опытах активной защиты мышей. *Результаты.* Белоксодержащие антигены пневмококка выделяли из *S. pneumoniae* серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F, 23F и 36. По химическому составу препараты содержали от 16 до 35 % белка. В SDS-электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ) установлено, что молекулярная масса БсАП находилась в диапазоне от 14 до 116 кДа. С помощью ИФА показана перекрестная активность нативных антигенов. Практически все препараты реагировали с антимикробной кроличьей сывороткой, полученной к 19F серотипу ( $p \leq 0,05$ ). Сыворотка 14 серотипа была менее активной, с ней взаимодействовали БсАП, полученные из 14 и 19F серотипов ( $p \leq 0,05$ ). В реакции преципитации по Оухтерлони подтверждено, что препараты

серотипов 3, 6B, 14, 19F и 36 реагировали с кроличьей иммунной сывороткой, полученной к серотипу 19F *S. pneumoniae*. В иммуноблоттинге установлено, что БсАП, выделенные из серотипов 3, 6B, 10A, 14, 19F и 36, связывались с моноклональными антителами к пневмококковому белку — пневмоллизину. В серии экспериментов *in vivo* показано, что БсАП защищали животных от внутрибрюшинного заражения *S. pneumoniae* в гомологичной и гетерологичной системах ( $p \leq 0,05$ ). **Заключение.** Выявленная иммунохимическая и перекрестная протективная активность БсАП в опытах *in vitro* и *in vivo* позволяет отобрать препараты, полученные из серотипов 6B, 10A, 19F и 36, как наиболее перспективные для дальнейшего изучения внутривидовой протективной активности отдельных нативных белков пневмококка.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 22—28

Ключевые слова: пневмококк, белоксодержащие антигены пневмококка, серотипнезависимая вакцина, иммуногенная активность, перекрестная активность, гомологичная защита, гетерологичная защита

*D.S.Vorobyev, I.B.Semenova, Yu.V.Volokh, E.E.Romanenko, A.P.Baturo, N.A.Mikhailova*

## PROPERTIES OF NATIVE PROTEIN-CONTAINING ANTIGENS OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

**Aim.** The study of immunochemical and immunobiological properties of native protein-containing antigens of pneumococcus. **Materials and methods.** The study was carried out on the strains of the Collective Usage Center «Collection of Mechnikov Res. Inst. for Vaccine and Sera». In the work studied the chemical composition, the molecular weight of the obtained antigens in SDS-electrophoresis and antibody titers in ELISA. Protective activity of protein-containing antigens of pneumococcus was determined in experiments of active protection of mice. **Results.** Protein-containing antigens of pneumococcus were isolated from *S. pneumoniae* serotypes 3, 6B, 10A, 14, 19F, 23F and 36. The chemical composition of the preparations contained from 16 to 35% protein. In SDS-electrophoresis in polyacrylamide gel it was established that the molecular weight of protein-containing antigens of pneumococcus ranged from 14 to 116 kDa. Using ELISA shows the cross-activity of native antigens. Virtually all drugs reacted with antimicrobial rabbit serum obtained to serotype 19F ( $p \leq 0,05$ ). Serotype serum 14 was less active and only protein-containing pneumococcal antigens obtained from 14 and 19F serotypes ( $p \leq 0,05$ ) interacted with it. In the precipitation test according to Ouchterlony it was confirmed that preparations of serotypes 3, 6B, 14, 19F and 36 reacted with rabbit immune serum obtained for *S. pneumoniae* 19F serotype. In immunoblotting it was found that protein-containing antigens of pneumococcus isolated from serotypes 3, 6B, 10A, 14, 19F and 36 were associated with monoclonal antibodies to pneumococcal protein — pneumolysin. **In vivo** experiments it was shown that protein-containing antigens of pneumococcus protected animals from intraperitoneal infection of *S. pneumoniae* in homologous and heterologous systems ( $p \leq 0,05$ ). **Conclusion.** The revealed immunochemical and cross-protective activity of protein-containing antigens of pneumococcus *in vitro* and *in vivo* experiments allows to select drugs derived from serotypes 6B, 10A, 19F and 36, as the most promising for further study of the intraspecific protective activity of individual native proteins of pneumococcus.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 22—28

Key words: pneumococcus, protein-containing antigens of pneumococcus, serotype-independent vaccine, immunogenic activity, cross-activity, homologous protection, heterologous protection

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема инфекций, вызванных *Streptococcus pneumoniae*, на протяжении нескольких десятилетий остается актуальной для России [1, 2, 5]. Пневмококк способен вызывать тяжелые инвазивные формы заболеваний среди детей и у взрослых людей [15]. Для профилактики пневмококковых инфекций используют зарубежные полисахаридные и конъюгированные вакцины, создающие защиту против ограниченного количества актуальных серотипов *S. pneumoniae* [5, 7]. При смене клинически значимых серотипов возбудителя полисахаридные антигены, входящие в состав пневмококковых вакцин, не позволяют создать защиту от невакцинных штаммов пневмококка [11].

Известно, что белки *S. pneumoniae* наряду с капсулой являются факторами вирулентности микроба и, соответственно, принимают участие в патогенезе инфекции и формировании иммунной защиты [3, 6]. Кроме того, пневмококковые белки обладают высокой гомологией между собой и, соответственно, могут формировать перекрестную внутривидовую защиту [9, 11, 14]. Поэтому перспективным направлением является изучение свойств белков пневмококка с целью выявления наиболее иммуногенных вариантов для создания отечественной серотипнезависимой вакцины.

Вакцины, основанные на конъюгации полисахаридных антигенов и гомологичных белков, предположительно должны создавать более выраженную защиту против *S. pneumoniae* по сравнению с существующими вакцинами.

Целью настоящей работы явилось исследование иммунохимических и иммунобиологических свойств нативных белоксодержащих антигенов пневмококка (БсАП).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы штаммы *S. pneumoniae* серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F, 23F и 36, полученные из ЦКП Коллекция ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова.

Опыты проводили на мышах линии Balb/c массой 16-18 г, полученных из питомника НЦ Биомедицинских технологий, филиал «Андреевка».

*S. pneumoniae* выращивали в сердечно-мозговом бульоне в течение 16-18 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C и 5% содержании углекислого газа. Полученную культуру инактивировали с помощью 0,1 N NaOH, затем ее центрифугировали, отделяли осадок клеток из культуральной жидкости и из надосадочной жидкости выделяли БсАП методом ацетонового осаждения. Полученные препараты лиофилизировали.

Химический анализ БсАП выполняли с помощью традиционных методов. Для определения общего белка в исследуемых препаратах использовали метод [13], углеводы определяли по методу [10], количество нуклеиновых кислот — по методу Спирина. Измерения проводили на спектрофотометре Ultrospec II E, Pharmacia LKB (Швеция). Для характеристики электрофоретической подвижности и определения молекулярной массы БсАП использовали вертикальный SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях [12]. Иммуноблоттинг проводили по общепринятой методике, используя для анализа моноклональные антитела IgG1 к пневмолизину (100 мкг/мл, Santa Cruz Biotechnology, USA). Специфичность белков оценивали визуально по окрашиванию мембраны.

Иммуноферментный анализ проводили согласно методу [8].

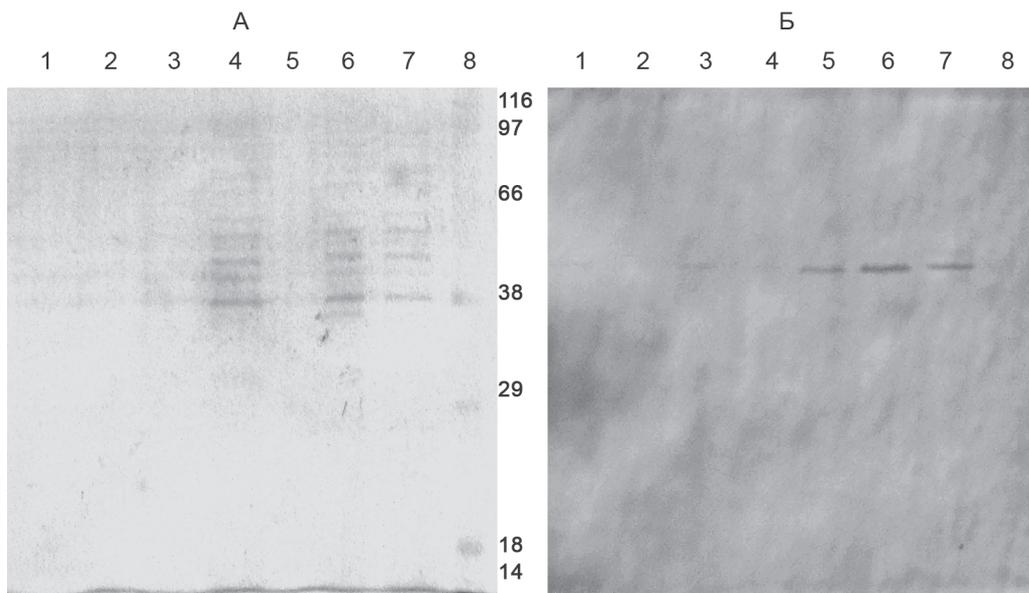
Для иммунизации животных использовали БсАП, которые растворяли в физиологическом растворе без добавления или с добавлением гидроксида алюминия (Sigma, США) из расчета 20 мкг Al(OH)<sub>3</sub> на 1 мкг белка. Сорбцию проводили в течение 12 ч при температуре 4°C. Белоксодержащие антигены пневмококка вводили внутривентрально двукратно с интервалом в 14 дней в дозах 10, 30, 50 и 100 мкг/мышь. Через две недели после повторного введения препарата мышей заражали внутривентрально суточной культурой *S. pneumoniae* в дозе 10<sup>5</sup> микробных клеток в 0,5 мл физиологического раствора (штамм №3) и в дозе 10<sup>4</sup> микробных клеток в 0,5 мл физиологического раствора (штамм №1156). В качестве контроля служили неиммунизированные мыши. Наблюдение за животными проводили в течение 10-14 дней.

Статистическая обработка. Результаты оценивали по выживаемости мышей в течение срока наблюдения, рассчитывая достоверность по методу С.А. Гланца [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Белоксодержащие антигены пневмококка получали из *S. pneumoniae* серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F, 23F и 36. По химическому составу препараты содержали от 16 до 35% белка, от 1 до 4% углеводов, от 3 до 6% нуклеиновых кислот.

В SDS-электрофорезе в полиакриламидном геле с использованием белкового красителя Кумасси R-250 выявили в составе полученных препаратов (серотипы 3, 6В, 10А, 14, 19F и 36) белки с молекулярной массой в диапазоне от 14 до 116 кДа (рис. А).



**SDS-электрофорез БсАП в 12% ПААГ (А) и нитроцеллюлезная мембрана после иммуноблоттинга БсАП (Б). Концентрация БсАП в каждой дорожке составила 5 мг/мл.**

Дорожки: 1 — БсАП 3 №3; 2 — БсАП 3 №1156; 3 — БсАП 6В; 4 — БсАП 10А; 5 — БсАП 14; 6 — БсАП 19F; 7 — БсАП 36; 8 — маркер молекулярной массы.

В иммуноблоттинге определено, что БсАП, выделенные из *S. pneumoniae* серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F и 36, связывались с моноклональными антителами IgG1 к пневмолизину (рис. Б). Это может свидетельствовать о перекрестной активности пневмолизина, содержащегося в препаратах, полученных из разных серотипов пневмококка.

В реакции преципитации по Оухтерлони БсАП серотипов 3, 6В, 14, 19F и 36 в концентрации 1 мг/мл реагировали с кроличьей иммунной сывороткой, полученной к серотипу 19F *S. pneumoniae*, что свидетельствовало о наличии перекрестно-реагирующих антигенов в изучаемых препаратах.

С помощью ИФА подтверждена перекрестная антигенная активность БсАП. Практически все препараты выявляли антитела в антимикробной кроличьей сыворотке, полученной к 19F серотипу (табл. 1). Отмечено повышение титров антител в 8 раз к БсАП 10А серотипа, в 16 раз к БсАП серотипов 3 (штамм №3), 6В и 36, в 32 раза к БсАП серотипов 14, 19F и 23F ( $p \leq 0,05$ ). Исключение составил препарат, выделенный из серотипа 3 (штамм №1156), который выявлял высокий титр антител в контроле. Антимикробная кроличья сыворотка, полученная к 14 серотипу, оказалась менее активной, в ней определяли повышение титра антител в 32 раза в гомологичной системе и повышение титра антител в 4 раза к БсАП 19F ( $p \leq 0,05$ ).

При взаимодействии с моноклональными антителами к пневмолизину БсАП, выделенных из серотипов 19F и 36, наблюдалось повышение титров антител в 4 и 8 раз (табл. 1), соответственно, что свидетельствовало о наличии этого белка в БсАП серотипов 19F и 36.

Белоксодержащие антигены пневмококка, полученные из серотипа 3, после двукратной иммунизации мышей с интервалом 14 дней защищали животных от заражения 8 LD<sub>50</sub> *S. pneumoniae* серотипа 3 №3 в дозах от 10 до 100 мкг/мышь. Защита составила 80-90 %, а при использовании сорбированного варианта — 100 % выживших ( $p \leq 0,05$ ) при 90% гибели мышей в контроле. При большей заражающей дозе (25 LD<sub>50</sub> *S. pneumoniae*) выявлена значимость добавления гидроксида алюминия.

Таблица 1. Титр перекрестнореагирующих IgG к препаратам разных серотипов пневмококка в сыворотках кроликов, иммунизированных инактивированными микробными клетками *S. pneumoniae*, и с моноклональными антителами к пневмоллизину в ИФА

Белоксодержащие антигены пневмококка разных серотипов, сорбированные на твердой фазе	Титр IgG в сыворотках кроликов, иммунизированных инактивированными микробными клетками <i>S. pneumoniae</i> серотипов				Титр IgG1 к пневмоллизину <i>S. pneumoniae</i>	
	14		19F		Опыт	Контроль (интактные)
	Опыт	Контроль (интактные)	Опыт	Контроль (интактные)		
3 №3	1:280	1:140	1:1920*	1:120	1:160	1:80
3 №1156	1:140	1:560	1:960	1:960	1:160	1:80
6B	1:140	1:140	1:1920*	1:120	1:160	1:80
10A	1:140	1:140	1:960*	1:120	1:160	1:80
14	1:4480*	1:140	1:3840*	1:120	Н.о.	Н.о.
19F	1:1120*	1:280	1:3840*	1:240	1:640*	1:160
23F	1:280	1:140	1:3840*	1:240	Н.о.	Н.о.
36	1:280	1:140	1:1920*	1:120	1:640*	1:80

Примечание. \* Достоверность разницы между опытом и контролем ( $p \leq 0,05$ ), увеличение титра антител в 4 и более раз, \*\* Н.о. — не определяли.

При иммунизации мышей БСАП в дозах 10 и 50 мкг/мышь защита составила 50% животных. Однако при использовании гидроксида алюминия все испытанные дозы создавали защиту на уровне 80-90% ( $p \leq 0,05$ ). Контроль гидроксида алюминия показал, что он не защищал мышей от заражения *S. pneumoniae*.

На следующем этапе изучена протективная активность препаратов БСАП в гомологичной и гетерологичной системах. Мышей иммунизировали двукратно антигенами, полученными из *S. pneumoniae* серотипов 3 №3, 14 и 19F в дозе 30 мкг/мышь с добавлением гидроксида алюминия (табл. 2, опыт I). Полученные результаты свидетельствовали, что все препараты защищали мышей от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 штамм №3 на 3 день после заражения, когда отмечалась 100% гибель животных в контроле. Подтвердилась высокая протективная активность БСАП серотипа 3 при заражении гомологичным серотипом. Среди БСАП других серотипов более активным оказался препарат серотипа 19F (80% выживших мышей), препарат из серотипа 14 защищал 60 % мышей. При наблюдении в течение 10 дней было выявлено, что гомологичный БСАП серотипа 3 защищал 100% мышей, гетерологичный БСАП, выделенный из серотипа 19F, защищал 70% животных ( $p \leq 0,05$ ), животные, иммунизированные препаратом из серотипа 14, к этому сроку погибли.

При увеличении дозы до 50 мкг/мышь в эксперименте выявлена перекрестная протективная активность препаратов БСАП, полученных из серотипов 6B, 10A, 14, 19F и 23F от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 №1156 (табл. 2, опыт II). Подтверждено, что гомологичный БСАП защищал 100% мышей при 90% гибели в контроле. Протективный эффект гетерологичных БСАП различался: препарат из серотипа 6B защищал 100% мышей, из серотипа 19F — 90%, а из серотипов 10A, 14 и 23F — 80% животных соответственно ( $p \leq 0,05$ ). Смесь БСАП из серотипов 6B, 10A, 14, 19F и 23F в суммарной дозе 50 мкг также защищала 80% мышей ( $p \leq 0,05$ ).

Аналогичные данные получены при увеличении иммунизирующей дозы до 100 мкг/мышь (табл. 2, опыт III). Повторно изучена перекрестная протективная активность препаратов БСАП, выделенных из серотипов 6B, 10A, 14, 19F, 23F и 36 от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 №1156. Белоксодержащие антигены пневмококка, выделенные из серотипа 3, защищали 90% мышей ( $p \leq 0,05$ ), как и гетерологичные БСАП из серотипов 6B и 36 ( $p \leq 0,05$ ). В группе животных, получавших препараты из серотипов 10A, 14, 19F и 23F, наблюдалась выживаемость от 60 до 70%, однако статистически значимой разницы между опытом и контролем в этих группах не выявлено. В контроле выжило 30 % мышей.

В предварительных опытах по изучению активной защиты мышей исследована протективная активность БСАП в гомологичной системе. В качестве модельного

Таблица 2. Выживаемость мышей при внутрибрюшинном двукратном введении БсАП серотипов 3, 6В, 10А, 14, 19F, 23F и 36 против заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 штамм №3\*\* (I опыт) и штамм №1156\*\*\* (II и III опыты)

№№ опытов	Название препарата для иммунизации	Выживаемость на 3 сутки***	Критерий значимости, Z
I	БсАП т.3 №3	10/10	4,12****
	БсАП т.14	6/10	2,69****
	БсАП т.19F	8/10	3,38****
	Контроль	0/10	—
Выживаемость на 10 сутки***			
II	БсАП т.3 №1156	10/10	3,83****
	БсАП т.6В	10/10	3,83****
	БсАП т.10А	8/10	2,94****
	БсАП т.14	8/10	3,2****
	БсАП т.19F	9/10	3,57****
	БсАП т.23F	8/10	3,12****
	БсАП т.6В + т.10А + т.14 + т.19F + т.23F	8/10	3,12****
	Контроль	1/10	—
III	БсАП т.3 №3	9/10	2,52****
	БсАП т.3 №1156	9/10	2,52****
	БсАП т.6В	9/10	2,52****
	БсАП т.10А	6/10	1,39
	БсАП т.14 (5 сер.)	7/10	1,76
	БсАП т.19F	7/10	1,69
	БсАП т.23F	7/10	1,87
	БсАП т.36	9/10	2,52****
Контроль	3/10	—	

Примечание. \* Заражение через 2 недели после двукратного введения БсАП серотипов 3 (штаммы №3 и №1156), 6В, 10А, 14, 19F, 23F и 36; \*\* для опыта I заражающая доза составила 19,95 LD<sub>50</sub>, для опыта II — 2,0 LD<sub>50</sub>, для опыта III — 1,6 LD<sub>50</sub>; \*\*\* в числителе число выживших мышей на 10 день, в знаменателе — число зараженных животных; \*\*\*\* достоверность разницы между опытом и контролем (p≤0,05) при Z ≥ 1,96 при сравнении кривых выживаемости по С.А. Гланцу. Доза препарата (мкг/мышь): I — 30, II — 50, III — 100.

штамма *S. pneumoniae* использовали штамм серотипа 3 №3, из которого выделяли БсАП и против которого проверяли способность препарата создавать защиту. Установлено, что препарат в иммунизирующих дозах 10, 50 и 100 мкг/мышь при различных заражающих дозах защищал животных от развития пневмококковой инфекции.

В серии экспериментов на животных получены результаты, подтверждающие гетерологичную защиту. Белоксодержащий антиген пневмококка, полученный из серотипа 19F, защищал 70% мышей при заражении *S. pneumoniae* серотипа 3 штамм №3, в то время как БсАП, выделенный из серотипа 14, в этом же опыте не защищал животных. Препараты БсАП, полученные из серотипов 6В, 10А, 14, 19F, 23F, защищали мышей от заражения гетерологичным штаммом №1156 *S. pneumoniae* серотипа 3. Защита составила 80-100%. Препараты, полученные из серотипов 6В и 36, защищали 90% животных при заражении *S. pneumoniae* серотипа 3 штамм №1156, а БсАП, выделенные из серотипов 14 и 19F, обеспечивали выживаемость 70% мышей, что оказалось статистически не достоверным, поскольку в контроле выжило 30% животных. Очевидно, разница в результатах зависела от иммунизирующих и заражающих доз. Сорбция БсАП на гидроксиде алюминия усиливала протективную активность в опытах по изучению гомологичной и гетерологичной защиты.

Эксперименты по определению перекрестной иммуногенной активности БсАП в реакции Оухтерлони и ИФА показали, что большинство препаратов (за исключе-

нием БсАП серотипа 10А в реакции преципитации) реагировали с антимикробной кроличьей сывороткой, полученной к 19F серотипу *S. pneumoniae*. В ИФА с кроличьей сывороткой, полученной к 14 серотипу *S. pneumoniae*, взаимодействовали только БсАП 14 и 19F серотипов. В целом, можно сказать, что полученные данные опытов *in vitro* подтверждаются результатами опытов *in vivo*.

Таким образом, БсАП, выделенные из *S. pneumoniae* серотипов 6В, 10А, 19F и 36, можно рассматривать как наиболее перспективные для дальнейшего изучения протективной активности отдельных нативных белков, входящих в их состав.

В мировой литературе описаны исследования по разработке экспериментальных вакцин на основе рекомбинантных белков пневмококка [11], в частности, пневмококкового поверхностного белка А (PspA); пневмолизина (Ply); пневмококкового поверхностного антигена А (PsaA) и других. Поэтому представляет, несомненно, интерес факт обнаружения пневмолизина с помощью моноклональных антител в большинстве выделенных БсАП. Учитывая трудоемкость выделения очищенных нативных белков *S. pneumoniae*, в дальнейшем планируются работы по получению ключевых рекомбинантных белков для создания отечественной серотипнезависимой пневмококковой вакцины.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белошицкий Г.В., Королева И.С. Серотиповая характеристика штаммов *S. pneumoniae* в Москве. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 1 (74): 90-97.
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., Курбатова Е.А. Белки *Streptococcus pneumoniae*: перспективы создания вакцины против пневмококковой инфекции. Журн. микробиол. 2010, 6: 98-104.
4. Гланц С.А. Медико-биологическая статистика. М., Практика 1999.
5. Костинов М.П., Андреева Н.П., Петрова Т.И. Клиническая и эпидемиологическая эффективность вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции у детей. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013, 3: 45-52.
6. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Факторы патогенности пневмококка и их протективные свойства. Журн. микробиол. 2014, 3:67-77.
7. Харит С.М. Пневмококковые вакцины. Вакцины и вакцинация. Под ред. В.В. Зверева, Б.Ф. Семенова, Р.М. Хаитова. 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. Chen A., Mann B., Gao G. et al. Multivalent pneumococcal protein vaccines comprising pneumolysin with epitopes/fragments of CbpA and/or PspA elicit strong and broad protection. Clin. Vaccine Immunol. 2015, 22 (10): 1079-89.
10. Dubois K., Gillers K., Hamilton J. et al. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956, 28 (3): 350-356.
11. Feldman C., Anderson R. Review: Current and new generation pneumococcal vaccines. J. Infect. 2014, 69 (4): 309-325.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature. 1970, 227: 680-685.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193: 265-275.
14. Tarahomjoo S. Recent approaches in vaccine development against *Streptococcus pneumoniae*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2014, 24 (4): 215-27.
15. Weiser J.N., Ferreira D.M., Paton J.C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. Nat. Rev. Microbiol. 2018, 16 (6): 355-367.