

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-3-21-27>

## Исследование иммунобиологических свойств поверхностных белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae* серотипа 6В

О. М. Кукина, И. М. Грубер\*, Н. К. Ахматова, О. В. Жигунова, Е. А. Курбатова, Н. Б. Егорова, Н. Е. Ястребова

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова

### Резюме

**Актуальность.** Профилактика пневмококковой инфекции в РФ осуществляется импортными полисахаридными и конъюгированными вакцинами без учета циркуляции клинически значимых изолятов, что приводит к росту распространения ранее редких генетических линий и серотипов, не входящих в состав вакцин, а также не защищает от носительства. Проводится разработка серотипнезависимых вакцин на основе протективных белков и вариантов цельноклеточных вакцин, способных обеспечить перекрёстный протективный эффект против пневмококка. **Цель работы.** Исследование протективных свойств поверхностных белоксодержащих антигенов, выделенных из иммуногенного штамма *S. pneumoniae* 6В № 296 и определение их влияния на ключевые эффекторы врождённого иммунитета. **Материалы и методы.** *S. pneumoniae* 6В № 296 культивировали в полусинтетической среде в стационарных условиях при 5% CO<sub>2</sub> в течение 5–7 ч. Из инактивированных бактериальных клеток получали экспериментальный исходный белоксодержащий препарат – водный экстракт (В/Э), из которого выделяли фракцию 30–100 kDa (ФР), и из стерильного надосадка культуральной жидкости – белоксодержащий препарат – супернатант (С/Н); в препаратах выявляли содержание белка. Иммунобиологические свойства изучали после двукратной внутрибрюшинной иммунизации мышей линии BALB/c. Протективную активность определяли после заражения вирулентными штаммами *S. pneumoniae* серотипов 6В № 1121 и 3 № 3. Фагоцитарную активность изучали по количеству гранулоцитов, поглотивших убитые нагреванием FITC-меченые клетки *S. aureus*. Экспрессию Толл-подобных рецепторов (TLRs) и субпопуляционную структуру лимфоцитов селезенок мышей исследовали после окрашивания FITC/PE-мечеными моноклональными антителами с помощью 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). **Результаты.** Установлен протективный эффект ФР при заражении вирулентными штаммами гомологичного (6В № 1121) и гетерологичного серотипов (3 № 3); С/Н защищал мышей при заражении штаммом 3 № 3. Все исследуемые препараты приводили к увеличению количества фагоцитирующих клеток (наибольший эффект отмечен при иммунизации ФР и С/Н) и стимулировали численность TLR2 и TLR4 позитивных клеток (наблюдалось повышение количества TLR2-экспрессирующих клеток при иммунизации Ф/Р по сравнению с В/Э). При изучении иммунофенотипа лимфоцитов мышей отмечено, что препараты индуцировали экспрессию эффекторов врождённого и адаптивного иммунитета. **Выводы.** В результате проведённых исследований показано, что протективная поверхностная белоксодержащая фракция с ММ 30–100 kDa является наиболее активным, из испытанных экспериментальных препаратов, стимулятором врожденного и адаптивного иммунитета и требует дальнейшего изучения для определения возможности использования при разработке серотипнезависимой пневмококковой вакцины.

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

Конфликт интересов не заявлен.

**Для цитирования:** Кукина О. М., Грубер И. М., Ахматова Н. К. и др. Исследование иммунобиологических свойств поверхностных белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae* серотипа 6В. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2020;19(3):21–27. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-3-21-27>.

### Study of the Immunobiological Properties of Surface Protein-Containing Antigens of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6B

OM Kukina, IM Gruber\*\*, NK Akhmatova, OV Zhigunova, EA Kurbatova, NB Egorova, NE Yastrebova  
Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

### Abstract

**Relevance.** Prevention of pneumococcal infection in the Russian Federation is carried out by imported polysaccharide and conjugated vaccines without taking into account the circulation of clinically significant isolates, which leads to the growth of previously rare genetic

\* Для переписки: Грубер Ирина Мироновна, 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](mailto:igruber_instmech@mail.ru). ©Кукина О. М. и др.

\*\* For correspondence: Gruber Irina M., Dr. Sci (Med), Professor, Head of the Laboratory of experimental microbiology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, +7 (495)-916-20-47, [igruber\\_instmech@mail.ru](mailto:igruber_instmech@mail.ru). ©Kukina OM et al.

lines and serotypes that are not part of the vaccines, and does not protect against the carriage. Serotype-independent vaccines are being developed based on protective proteins and variants of whole-cell vaccines capable of providing a cross-protective effect against pneumococcus. **Objective.** Investigation of the protective properties of surface protein-containing antigens isolated from the immunogenic strain *S. pneumoniae* 6B No. 296 and their influence on key effectors of innate immunity. **Materials and methods.** *S. pneumoniae* 6B No. 296 was cultured in a semi-synthetic medium under stationary conditions at 5% CO<sub>2</sub> for 5–7 hours. From inactivated bacterial cells, the experimental initial protein-containing preparation was obtained - an aqueous extract (A/E), from which a 30–100 kDa fraction (FR) isolated, and from the sterile culture supernatant, the protein-containing preparation – supernatant (S/N); in the preparations, the protein content was determined. Immunobiological properties were studied after double intraperitoneal immunization of BALB/c mice. The protective activity was determined after infection with virulent strains of *S. pneumoniae* serotypes 6B No. 1121 and No. 3. Phagocytic activity was studied by the number of granulocytes that absorbed heat-killed FITC-labeled *S. aureus* cells. The expression of Toll-like receptors (TLRs) and the subpopulation structure of mouse spleen lymphocytes were investigated after staining with FITC/PE-labeled monoclonal antibodies using flow cytometry. Statistical analysis of materials was carried out using parametric and non-parametric methods using the software package «Statistica for Windows», ver. 7.0 (Stat Soft, Inc). **Results.** The protective effect of FR upon infection with virulent strains of homologous (6B No. 1121) and heterologous serotypes (3 No. 3) was established; S/N protected mice when infected with strain 3 No. 3. All the studied drugs led to an increase in the number of phagocytic cells (the greatest effect was observed upon immunization with FR and S/N) and stimulated the expression of TLR2 and TLR4 positive cells (there was an increase in the number of TLR2-expressing cells during immunization with FR compared with A/E). When studying the immunophenotype of mouse lymphocytes, it was noted that the preparations induced the expression of effectors of innate and adaptive immunity. **Conclusions.** As a result of the studies, it was shown that the protective surface protein-containing fraction with MM 30–100 kDa is from tested experimental preparations the most active stimulator of innate and adaptive immunity, and requires further study to determine the possibility of using the serotype-independent pneumococcal vaccine in the development.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, serotype-independent protective activity, experimental protein-containing preparation  
No conflict of interest to declare.

**For citation:** Kukina OM, Gruber IM, Akhmatova NK, et al. Study of the Immunobiological Properties of Surface Protein-Containing Antigens of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6B. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020;19(3):21–27. (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-3-21-27>.

## Введение

*Streptococcus pneumoniae*, грамположительные бактерии, являющиеся возбудителями широкого спектра заболеваний как инвазивного, так и неинвазивного характера, которые могут быть причиной серьёзных осложнений и приводить к летальному исходу, в первую очередь у детей и лиц старшего возраста.

В РФ с 2014 г. проводится вакцинопрофилактика импортными пневмококковыми (полисахаридной и конъюгированными) вакцинами, защищающими от наиболее распространённых в мире серотипов, что не обеспечивает защиту от других серотипов, не входящих в состав вакцин, а также от бескапсульных штаммов; отмечается появление редких генетических линий пневмококка, отличающихся множественной устойчивостью к антибиотикам; наблюдается появление других видов этиологически значимых возбудителей заболеваний респираторного тракта [1–3]. На Первой Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой современной иммунопрофилактике, подчеркивалась необходимость «совершенствования стратегии и тактики иммунизации ... против таких бактериальных инфекций, как пневмококковая ... в целях не только снижения заболеваемости и смертности, но и профилактики формирования антибиотикорезистентности» [4]. В связи с этим актуальной является новая стратегия разработки серотипнезависимых вакцин на основе протективных белков и разных вариантов цельноклеточных вакцин [5–7].

Ранее при изучении водорастворимых поверхностных белоксодержащих антигенных компонентов штаммов 9 серотипов *S. pneumoniae* наиболее выраженный перекрестный протективный эффект был отмечен у антигенов штаммов пневмококка серотипов 6В, 10А и 19F [8]. При этом иммунизация мышей препаратом из штамма серотипа 6В показала 100% выживаемость при заражении 10<sup>5</sup> и 10<sup>7</sup> м.к. того же слабо вирулентного штамма в сравнении с 60% и 40% выживаемостью в контроле соответственно. В то же время при иммунизации мышей тем же препаратом заражение 10<sup>5</sup> м.к. штамма гетерологичного серотипа 3 № 3 показало 30% выживаемость при 20% выживаемости в контроле. Однако эти экспериментальные препараты из штаммов различных серотипов, в том числе 6В, характеризовались высокой внутривидовой перекрестной серологической активностью, и в дальнейших исследованиях представляет интерес изучения их иммуногенных свойств.

**Цель работы** – изучить протективные свойства поверхностных белоксодержащих антигенов, выделенных из иммуногенного штамма *S. pneumoniae* серотипа 6В, и определить их влияние на ключевые эффекторы врождённого иммунитета.

## Материалы и методы

Экспериментальные поверхностные белоксодержащие препараты получали из маловирулентного иммуногенного штамма *S. pneumoniae* 6В № 296, депонированного в коллекции ФГБУ «НЦЭСМП»

РФ (патент РФ № 2601158 от 06.11.2016 г.). Периодическое культивирование штамма-продуцента проводили в полусинтетической среде [9] в стационарных условиях при 5% CO<sub>2</sub> в течение 5–7 ч (до конца фазы экспоненциального роста). Из бактериальных клеток, осаждённых при центрифугировании полученной культуральной жидкости, инактивированных и высушенных диметилкетонем, методом водной экстракции выделяли бактериальный экстракт и его лиофильно высушивали (В/Э). Из полученного бактериального водного экстракта выделяли фракцию 30–100 kDa с использованием фильтров Amicon® Ultra (Millipore, Ирландия) с порогом отсека 100 kDa и 30 kDa (ФР). Для получения препарата из супернатанта культуральной жидкости её подвергали фильтрации через стерилизующий фильтр с диаметром пор 0,22 µm (Millipore, США); белоксодержащие компоненты фильтрата осаждали сульфатом аммония (1:1); осадок, полученный после центрифугирования, ресуспендировали в дистиллированной воде и для освобождения от сульфата аммония проводили диализ против дистиллированной воды в течение 3 суток, после чего лиофильно высушивали (С/Н). В полученных препаратах определяли содержание белка по методу Лоури.

Иммунобиологические свойства препаратов изучали в экспериментах активной защиты мышей и с помощью методов исследования врождённого и адаптивного иммунитета. Для этого использовали мышей линии BALB/c (180 самцов, 12–14 г), полученных из питомника филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА, содержащихся в условиях вивария ФГБУН НИИВС им. И. И. Мечникова. Мышей выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217-2014). Мышей (одинаковое количество в опытной и контрольной группах) иммунизировали внутрибрюшинно (в/бр) двукратно полученными белоксодержащими антигенами (опытная группа) с интервалом 14 суток. Разовую иммунизирующую дозу вводили в изотоническом растворе натрия хлорида в объеме 0,5 мл. Через 14 суток после второй иммунизации мышей опытной и контрольной (неиммунизированных) групп заражали в/бр в объеме 0,5 мл дозой 10<sup>4</sup> микробных клеток (м.к.) штаммов *S. pneumoniae*, выращенных на кровяном агаре. Для заражения использованы вирулентные штаммы *S. pneumoniae* разных серотипов: 6В № 1121 (выделен из ликвора больного гнойным менингитом в ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), и 3№ 3 (коллекция ФГБУ «НЦЭСМП» РФ).

Влияние поверхностных белоксодержащих препаратов на ключевые эффекторы врождённого и адаптивного иммунитета определяли через 7 дней после второй иммунизации. Фагоцитарную активность оценивали по поглотительной способности гранулоцитов периферической крови

иммунизированных мышей (n = 5) в отношении убитых нагреванием микробных клеток *S. aureus*, окрашенных FITC. К периферической крови мышей прибавляли FITC-меченые бактерии (10<sup>9</sup> микробных клеток/мкл). Количество гранулоцитов, захвативших FITC-меченые бактерии, выявляли с помощью проточной цитометрии (Cytomix FC-500, фирма «Beckman Coulter», США с СХР программным обеспечением). Гейт клеточной популяции определяли путем оценки фронтального и бокового светорассеивания и размера клеток; в каждом гейте оценивали 10 000 клеток. Результат представляли как процент гранулоцитов, фагоцитировавших убитые нагреванием FITC-меченые бактериальные клетки *S. aureus*. Для изучения экспрессии Толл-подобных рецепторов (TLRs) и субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови мышей лимфоциты окрашивали согласно инструкции производителя (eBioscience, США) моноклональными антителами, мечеными флюорохромом к поверхностным клеточным маркерам (TLR2, TLR4, CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, МНС II, меченых FITC; CD45, CD25, NK1.1-PE; Foxp3). Для исследования Foxp3 клетки предварительно обрабатывали пермеабилзирующим буфером (Permeabilization Wash Buffer, Biolegend, США) согласно инструкции производителя. При учете результатов подсчитывали 5000 клеток в гейте.

Статистический анализ материалов проведен с применением параметрических и непараметрических методов с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows», ver. 7.0 (Stat Soft, Inc). Протективную активность препаратов оценивали по критерию согласия  $\chi^2$  и по показателю изучения динамики выживаемости мышей Z [10]. Средние выборочные значения количественных признаков приведены в виде Me (Q1–Q3), где Me – медиана, Q1 – нижний квартиль, Q3 – верхний квартиль; использованы непараметрические методы – U-критерий Манна-Уитни, критерии согласия  $\chi^2$  и сравнения кривых выживаемости Z [10]. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости p принимался равным < 0,05.

### Результаты и обсуждение

Как отмечено ранее [8], один из трёх антигенов штаммов пневмококка, обладающих перекрестной протективной активностью, – белоксодержащий препарат штамма *S. pneumoniae* 6В № 296, впоследствии депонированного как перспективный вакцинный штамм, использован в наших исследованиях в качестве модельного штамма при изучении трёх типов антигенов, полученных разными способами. Так, из инактивированных бактериальных клеток получали В/Э – исходный белоксодержащий препарат, из которого выделяли фракцию 30–100 kDa, и из стерильного супернатанта культуральной жидкости – белоксодержащий препарат – С/Н.

В таблице 1 представлены результаты изучения протективной активности поверхностных белоксодержащих

## Original Articles

антигенов – В/Э, ФР и С/Н, которыми иммунизировали мышей и впоследствии заражали вирулентными штаммами *S. pneumoniae* гомологичного (6В № 1121) и гетерологичного (3 № 3) серотипов.

В первом эксперименте при заражении вирулентным штаммом *S. pneumoniae* гомологичного серотипа 6В № 1121 установлены значимые различия в выживаемости мышей, иммунизированных лишь фракцией 30 – 100 kDa, по сравнению с контролем, на основании расчета критерия Z, характеризующего сравнительную динамику выживаемости мышей:  $Z = 2,01$ ,  $p < 0,05$ . Во втором эксперименте при заражении мышей дозой  $10^4$  м.к. вирулентного штамма *S. pneumoniae* гетерологичного серотипа 3 № 3, соответствующей  $18 LD_{50}$  ( $LD_{50}$  штамма  $5,6 \times 10^2$  м.к) подтверждена протективная активность фракции 30–100 kDa, при иммунизации которой после заражения выжило 60% мышей по сравнению со 100% гибелью в контроле ( $Z = 2,28$ ,  $p < 0,05$ ). При сравнении результатов анализа по критерию согласия также отмечены значимые различия между мышами, иммунизированными фракцией и не иммунизированными (контрольными) –  $\chi^2 = 5,95$ , ( $p < 0,02$ ). Кроме того, определен протективный

эффект супернатанта по сравнению с контролем ( $Z = 2,28$ ,  $p < 0,05$ ).

Для выяснения действия изучаемых поверхностных белоксодержащих антигенов на ключевые эффекторы врожденного иммунитета, от активации которого зависит интенсивность развития адаптивного иммунного ответа, исследовали их влияние на фагоцитарную активность гранулоцитов мышей, экспрессию Толл-подобных рецепторов (TLRs) и изменение иммунофенотипа лимфоцитов мышей через 7 дней после двукратной иммунизации дозой белка на мыш 50 мкг (для В/Э и Ф/Р) и 25 мкг (для С/Н).

Изучение влияния на фагоцитарную активность показало, что все исследованные препараты приводили к увеличению содержания фагоцитирующих клеток по сравнению с контролем. При этом максимальное увеличение числа фагоцитирующих клеток (%) наблюдалось в группе мышей, иммунизированных фракцией 30–100 kDa и супернатантом (табл. 2).

Изучение содержания клеток, экспрессирующих Толл-подобные рецепторы (TLRs), показало, что у мышей все исследованные препараты повышали численность TLR2 и TLR4 позитивных клеток в крови по сравнению с контролем (табл. 3). Число

**Таблица 1. Протективная активность белоксодержащих препаратов, выделенных из *S. pneumoniae* 6В № 296, после иммунизации мышей линии BALB/c и последующего заражения дозой  $10^4$  м.к. штаммов *S. pneumoniae* гомологичного (6В № 1121) и гетерологичного (3 № 3) серотипов**

**Table 1. The protective activity of protein-containing preparations isolated from *S. pneumoniae* 6B No. 296 after immunization with BALB/c mice and subsequent infection with a dose of  $10^4$  m.c. strains of *S. pneumoniae* homologous (6B No. 1121) and heterologous (3 No. 3) serotypes**

№ опыта No experience	Иммунизирующий препарат Preparation for immunization		Заражение: серотип, штамм Infection: serotype, strain	Гибель мышей на сутки: The death of mice per day:								Выжило / всего заражено Survived / total infected
	Наименование Name	Доза, мкг белка Dose, mcg protein		1	2	3	4	5	6	7	8	
1	Водный экстракт Water extract	50	6В, № 1121				1	1	2	3		2/9
	Фракция 30–100 kDa Fraction 30–100 kDa							2	2	1		4/9 *
	Супернатант Supernatant	100			2	1	2	1	2	1		0/9
	Контроль Control	–					2	3	3		1	0/9 *
2	Водный экстракт Water extract	50	3, №3		2	7						1/10
	Фракция 30–100 kDa Fraction 30–100 kDa				4							6/10 **
	Супернатант Supernatant	25			1	6						3/10 ***
	Контроль Control	–			5	5						0/10 ***

Примечание: Достоверность различий между опытом и контролем: по динамике выживаемости мышей \* $Z = 2,01$ ,  $p < 0,05$  при критическом значении  $> 1,92$ ; \*\*\* $Z = 2,28$ ,  $p < 0,05$  при критическом значении  $\geq 2,086$  (при 20 мышках в опыте); по критерию согласия \*\* $\chi^2 = 5,95$ ,  $p < 0,02$ .  
Note: Significance of differences between experiment and control: on the dynamics of mouse survival \* $Z = 2,01$ ,  $p < 0,05$  at a critical value  $\geq 1,92$ ; \*\*\* $Z = 2,28$ ,  $p < 0,05$  at a critical value  $\geq 2,086$  (with 20 mice in the experiment); according to the criterion of consent \*\* $\chi^2 = 5,95$ ,  $p < 0,02$ .

**Таблица 2. Влияние экспериментальных белоксодержащих пневмококковых препаратов на фагоцитарную активность гранулоцитов у мышей (через 7 дней после двукратной иммунизации)**

Table 2. The effect of experimental protein-containing pneumococcal preparations on the phagocytic activity of granulocytes in mice (7 days after double immunization)

Количество фагоцитирующих клеток (%), M ± SD, Me (Q1–Q3) The number of phagocytic cells (%), M ± SD, Me (Q1–Q3)			
Контроль (не иммунизированные) Control (not immunized)	Водный экстракт <sup>''</sup> Water extract <sup>''</sup>	Фракция 30–100 kDa <sup>'''</sup> Fraction 30–100 kDa <sup>'''</sup>	Супернатант <sup>''''</sup> Supernatant <sup>''''</sup>
75,98 ± 2,23 76,1(74–77,7)	82,92 ± 2,53 82,5(81–85) <sup>''''</sup>	93,12 ± 2,17 93,8(92,2–94,5) <sup>''''</sup>	91,06 ± 1,76 91,3(90–92,1) <sup>''''</sup>

Примечание: <sup>''''</sup> <sup>''''</sup> <sup>''''</sup> достоверность различий между исследуемыми группами, p < 0,05 (Mann-Whitney U-test).  
Note: <sup>''''</sup> <sup>''''</sup> <sup>''''</sup> significance of differences between the study groups, p < 0.05 (Mann-Whitney U-test).

**Таблица 3. Влияние экспериментальных белоксодержащих пневмококковых препаратов на содержание TLRs-экспрессирующих гранулоцитов мышей (через 7 дней после двукратной иммунизации)**

Table 3. The effect of experimental protein-containing pneumococcal preparations on the number of TLRs-expressing granulocytes of mice (7 days after double immunization)

TLRs	Количество клеток (%), M ± SD, Me(Q1–Q3) The number of cells (%), M ± SD, Me (Q1–Q3)			
	Контроль (не иммунизированные) Control (not immunized)	Водный экстракт <sup>''</sup> Water extract <sup>''</sup>	Фракция 30–100 kDa <sup>'''</sup> Fraction 30–100 kDa <sup>'''</sup>	Супернатант <sup>''''</sup> Supernatant <sup>''''</sup>
TLR2	45,54 ± 3,28 45,7(43,5–48)	55,88 ± 4,99 55,3(52–60,4) <sup>''''</sup>	67,66 ± 4,32 68,3(64,2–71,5) <sup>''''</sup>	62,86 ± 4,03 62,7(59,6–66,7) <sup>''''</sup>
TRL4	26,72 ± 2,51 27,8(25–28)	48,8 ± 3,98 48(46–52,8) <sup>''''</sup>	60,24 ± 2,85 60,7(59,1–62) <sup>''''</sup>	52,24 ± 3,45 52,2(49,4–55) <sup>''''</sup>

Примечание: <sup>''''</sup> <sup>''''</sup> <sup>''''</sup> достоверность различий между исследуемыми группами, p < 0,05 (Mann-Whitney U-test).  
Note: <sup>''''</sup> <sup>''''</sup> <sup>''''</sup> significance of differences between the study groups, p < 0.05 (Mann-Whitney U-test).

TLR2-экспрессирующих клеток было выше при иммунизации фракцией 30–100 kDa по сравнению с водным экстрактом. При иммунизации фракцией 30–100 kDa количество TLR4-экспрессирующих клеток было выше по сравнению с бактериальным экстрактом и супернатантом.

Изучение иммунофенотипа лимфоцитов мышей выявило, что все изучаемые препараты вызывали повышение количества цитотоксических лимфоцитов – CD8a+/CD3+, Т-хелперов – CD45+/CD4+, регуляторных клеток – CD4+/CD25+/Foxp3+, натуральных киллеров (NK) – CD16/32+CD3+, натуральных Т-киллеров (NKT) – CD16/32+/CD3+, В2-лимфоцитов – CD45+/CD19+ (особенно, под действием С/Н), В1-лимфоцитов – CD5+ (при снижении под действием С/Н), клеток, экспонирующих молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II, за исключением количества общих Т-лимфоцитов CD45+/CD3+ (табл. 4).

Различия между препаратами выявлены в содержании В-лимфоцитов. Так, супернатант в большей степени, чем водный экстракт и фракция 30–100 kDa, способствовал повышению количества В2-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD45+/CD19+, и в меньшей степени по сравнению с водным экстрактом

и фракцией 30–100 kDa – В1-лимфоцитов с маркером CD5+.

### Выводы

1. Из изученных препаратов (исходный водный экстракт, фракция 30–100 kDa, супернатант), полученных из вакцинного штамма *S. pneumoniae* 6В № 296, наибольшая протективная активность в отношении штамма как вирулентного гомологичного (6В № 1121), так и гетерологичного (3 № 3) серотипов отмечена для ФР. Протективная активность в отношении штамма гетерологичного серотипа также выявлена у С/Н.
2. Оценка влияния изученных препаратов на эф- фекторы врожденного иммунитета показала существенное повышение количества клеток, экспрессирующих TLR4 при воздействии ФР, и TLR2 – при действии ФР и С/Н. Также было выявлено увеличение фагоцитарной активности гранулоцитов мышей под влиянием данных экспериментальных препаратов. Кроме того, под действием С/Н отмечено более значительное снижение численности В1 лимфоцитов на фоне повышения числа В2-лимфоцитов.
3. В результате проведенных исследований показано, что белоксодержащая фракция с ММ 30–100 kDa является наиболее активным стимулятором

**Таблица 4. Влияние экспериментальных белоксодержащих пневмококковых препаратов на иммунофенотип лимфоцитов мышей (через 7 дней после двукратной иммунизации)****Table 4. The effect of experimental protein-containing pneumococcal drugs on the immunophenotype of mouse lymphocytes (7 days after double immunization)**

Лимфоциты Lymphocytes	Количество клеток (%), M ± SD, Me(Q1–Q3) The number of cells (%), M ± SD, Me (Q1–Q3)			
	Контроль (не иммунизированные) Control (not immunized)	Водный экстракт Water extract	Фракция 30–100 kDa Fraction 30–100 kDa	Супернатант Supernatant
CD45+/CD3+	66,08 ± 1,84 65,1(65–67,8)	68,68 ± 2,32 68,4(68–70,5)	67,94 ± 2,37 67,9(67,8–69,3)	66,1 ± 3,56 65,5(63,5–69,4)
CD8a+/CD3+	10,72 ± 1,71 11,5(9,2–11,8)	16,9 ± 3' 16,6(14,2–19,5)	17,04 ± 2,95' 16,6(14,8–19,6)	15,58 ± 2,65' 14,2(13,8–17,3)
CD45+/CD4+	39,88 ± 2,16 40,5(38–41,2)	54,92 ± 2,33' 54,1(53,2–56,7)	48,74 ± 3,8' 48,9(45–52)	44,46 ± 2,77' 44,1(42,2–46,5)
CD45+/CD25+	2,98 ± 0,76 3(2,5–3,2)	7,16 ± 0,59' 7(6,8–7,5)	6,7 ± 1,3' 6(5,9–7,5)	5,8 ± 1,06' 5,7(4,9–6,2)
CD4+/CD25+/Foxp3+	2,36 ± 0,2 2,4(2,2–2,5)	4,92 ± 0,3' 4,9(4,8–5,1)	4,96 ± 0,33' 4,9(4,7–5,2)	3,88 ± 0,39' 3,8(3,6–4)
CD16/32+CD3+ (NK)	5,88 ± 1,0 6,1(5,4–6,2)	11,18 ± 1,77' 11,8(10,2–12,3)	13,84 ± 1,96' 13,8(12,5–15,3)	13,42 ± 1,67' 13,4(12,2–14,6)
CD16/32+/CD3- (NK-T)	0,35 ± 0,16 0,4(0,3–0,45)	1,11 ± 0,26' 1,1(0,9–1,2)	1,08 ± 0,2' 1,1(0,9–1,27)	1,08 ± 0,23' 1,1(0,9–1,2)
CD45+/CD19+	18,26 ± 1,42 18,5(17,3–19,1)	24,58 ± 1,42' 24,2(23,9–25,6)	27,12 ± 1,39' 26,5(26,5–27,6)	29,43 ± 1,29' "" 29,5(28,3–30,3)
CD5+	62,86 ± 1,82 62,7(61,8–64,3)	69,76 ± 1,1' "" 70(69–70,5)	70,36 ± 1,45' "" 70,4(69,7–71,4)	60,14 ± 1,56' "" 60,5(59,2–61)
CD45+/MHC II+	17,6 ± 0,62 17,5(17,3–18)	28,3 ± 1,7' 28,9(27,7–29)	26,52 ± 2,46' 27,6(25–28)	27,9 ± 1,35' 27,3(27–28,5)

Примечание: "" "" достоверность различий между исследуемыми группами,  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U-test).Note: ' ' "" significance of differences between the study groups,  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U-test).

врожденного и адаптивного иммунитета по сравнению с исходным препаратом водного экстракта, из которого она получена, и супернатантом,

что требует дальнейшего изучения для определения возможности использования при разработке серотипнезависимой пневмококковой вакцины.

## Литература

1. 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.
2. Hicks L, Harison L, 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.
3. Kim L, McGee L, Tomczyk S, et al. Biological and Epidemiological Features of Antibiotic-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Pre- and Post-Conjugate Vaccine Eras: a United States Perspective // Clinical Microbiology Reviews. 2016. Vol. 29, N 3. P. 525–552.
4. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы». // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2020. Т. 10, № 1. С. 111–112.
5. Darrieux M, Goulart C, Briles D, et al. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines. // Critical Reviews in Microbiology. 2015. Vol. 41, N. 2. P. 190–200.
6. Pichichero M. Pneumococcal whole-cell and protein-based vaccines: Changing the paradigm. // Expert Review of Vaccines. 2017; Vol. 16, N 12. P. 118–1190.
7. Principi N, Esposito S. Development of pneumococcal vaccines over the last 10 years // Expert Opinion on Biological Therapy. 2018. Vol. 18, N 1. P. 7–17.
8. 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.
9. 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.
10. Гланц С. А. Медико-биологическая статистика. М.: Издательство «Практика»; 1999.

## References

1. 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.).
2. Hicks L, Harison L, 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(9):1346–1354. doi: 10.1086/521626.
3. Kim L, McGee L, Tomczyk S, et al. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: a united states perspective. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016; 29(3):525–552. doi:10.1128/CMR.00058-15.

- All-Russian Scientific-Practical Conference with International Participation «Current Immunization: challenges, opportunities, prospects». *Epidemiology and Infectious Diseases. Current items.* 2020; 10(1):111–112 (In Russ.). doi: 10.18565/epidem.2020.10.1.111-112.
- 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.
- Pichichero M. 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.
- 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.
- 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.).
- 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.).
- Glantz SA. *Primer of biostatistics.* 4th ed. Moscow: Praktika; 1999 (In Russ.).

## Об авторах

- Ольга Максимовна Кукина** – мл. науч. сотр. лаборатории экспериментальной микробиологии НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. +7(495)-916-20-47, kukina1994@mail.ru. 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.
- Ольга Валерьевна Жигунова** – мл. науч. сотр. лаборатории экспериментальной микробиологии НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. +7(495)-916-20-47, kileva@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.
- Надежда Борисовна Егорова** – д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. +7(903)5521473, vmegorova@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.

Поступила: 15.04.2020. Принята к печати: 29.05.2020.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

## About the Authors

- Olga M. Kukina** – junior researcher of the Laboratory of experimental microbiology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera. +7(495)-916-20-47, kukina1994@mail.ru. 0000-0003-0875-4141.
- Irina M. Gruber** – Dr. Sci (Med), Professor, Head of the Laboratory of experimental microbiology, 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.
- 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.
- Ekaterina A. Kurbatova** – Dr. Sci (Med), Professor, Head of the Laboratory of therapeutic vaccines, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera. +7(495)-917-57-74, kurbatova6162@yandex.ru.
- Nadezhda B. Egorova** – Dr. Sci (Med), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, leading researcher of Laboratory therapeutic vaccines, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera. +7(903) 5521473, vmegorova@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, yastreb03@rambler.ru.

Received: 15.04.2020. Accepted: 29.05.2020.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.

## ИНФОРМАЦИЯ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

### Об эпидемиологической ситуации по инфекциям, передающимся клещами

Пресс-релиз от 29 июня 2020 г.

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека продолжает проведение оперативного мониторинга, в связи с началом активности клещей.

По еженедельным данным, в настоящее время обращаемость в медицинские организации пострадавших от присасывания клещей не превышает среднемноголетних значений. Зарегистрированы единичные случаи заболевания инфекциями, передаваемыми клещами.

В большинстве субъектов приступили к акарицидным обработкам, проведены обработки более 84 тыс. га территории.

На территории Южного и Северо-Кавказского федеральных округов проводятся акарицидные обработки крупного и мелкого рогатого скота.

С начала года привито от клещевого энцефалита более 1,65 млн человек, планируется привить более 3 млн человек.

В субъектах Российской Федерации обеспечена готовность лабораторий по исследованию клещей, исследовано более 129 тыс. клещей.

С участием специалистов Роспотребнадзора на федеральных и региональных телеканалах вышло 970 сюжетов, опубликовано свыше 2,9 тыс. информационных сообщений по предупреждению распространения инфекций, передающихся с укусами насекомых, издано более 365 тыс. памяток.

Ситуация остается на контроле Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Источник: <https://www.rospotrebnadzor.ru/>