https://doi.org/10.31631/2073-3046-2025-24-2-24-32

Сравнительный анализ факторов патогенности близкородственных стрептококков группы *Mitis* и выделенных из них поверхностных белоксодержащих антигенов

О. М. Афанасьева*, И. М. Грубер, Д. С. Воробьев, О. В. Жигунова, М. Н. Дмитриева

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

Резюме

Актуальность. *К стрептококкам группы Mitis (Mitis Group Streptococci – SMG), относят 9 видов стрептококков, наиболее часто выделяемых от больных, в том числе Streptococcus oralis и Streptococcus pneumoniae. При изучении SMG показаны не только различия, но и совпадения в генах, кодирующих факторы патогенности S. pneumoniae и S. oralis. Ранее было показано, что антигены S. pneumoniae серотипа 6B индуцировали перекрестное протективное действие в отношении вирулентных штаммов S. pneumoniae. Было установлено, что экспериментальная поверхностная белоксодержащая фракция с молекулярной массой 30–100 кДа (БСФ) S. oralis обладает протективной активностью, стимулирует у мышей врожденный и адаптивный иммунитет.* ***Цель.*** *Сравнительный анализ факторов патогенности штаммов S. oralis и S. pneumoniae и протективной активности выделенных из них поверхностных белоксодержащих антигенов.* ***Материалы и методы.*** *Использованы штаммы S. oralis и S. pneumoniae серотипа 6B № 3353 и № 1121 разной вирулентности. Из этих штаммов получали экспериментальные белоксодержащие антигены, в частности, БСФ. Протективную активность полученных БСФ оценивали в опытах активной защиты при внутрибрюшинной иммунизации и заражении мышей линии BALB/c. Масс-спектрометрическое исследование БСФ проведено с использованием базы данных UniProtKB, таксон S. pneumoniae серотипа 4 (штамм ATCC BAA-334/TIGR4.) Статистическую обработку результатов проводили с применением параметрических и непараметрических методов сравнения ($p < 0,05$).* ***Результаты и обсуждение.*** *БСФ S. oralis обладает межвидовой протективной активностью в отношении вирулентных штаммов S. pneumoniae разных серотипов, в то время как БСФ штамма S. pneumoniae 6B № 3353 защищает только от вирулентного штамма гомологичного серотипа. При сравнительном анализе генов, кодирующих факторы патогенности, выявлены отличия: только в S. oralis определены гены, кодирующие синтез белков, способствующих адгезии и образованию биопленок (SspA, GtfD RlrA), а в штаммах S. pneumoniae – порообразующего токсина (Ply) и холин-связывающего белка (LytA). При протеомном анализе БСФ S. oralis и S. pneumoniae 6B № 3353 из 673 идентифицированных белков отобрано 57 общих белков, представляющих наибольший интерес, и, соответственно, 21 и 35 уникальных белка для каждой БСФ: в БСФ S. oralis определены белки адгезии, а также относящиеся к системам метаболизма и опосредованно участвующие в развитии инфекционного процесса, в то время как в БСФ S. pneumoniae преобладают белки, относящиеся к основным факторам патогенности.* ***Заключение.*** *Поверхностная белоксодержащая фракция 30 –100 кДа (БСФ), выделенная из слабовирулентного штамма S. oralis, относящегося к стрептококкам группы Mitis, обладает межвидовой протективной активностью в отношении штаммов близкородственного вида – S. pneumoniae различных серотипов. БСФ способна как к предупреждению адгезии и колонизации пневмококка, так и, возможно, к выполнению роли естественного адъюванта. Кроме того, может представлять интерес определение протективного действия этого антигена в отношении других близкородственных представителей SMG.*

Ключевые слова: *стрептококки группы Mitis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus oralis, серотипнезависимая протективная активность, вирулентность, экспериментальный белоксодержащий препарат, поверхностная белоксодержащая фракция, факторы патогенности*

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: *Афанасьева О. М., Грубер И. М., Воробьев Д. С. и др. Сравнительный анализ факторов патогенности близкородственных стрептококков группы Mitis и выделенных из них поверхностных белоксодержащих антигенов. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2025;24(2):24-32. https://doi:10.31631/2073-3046-2025-24-2-24-32*

* *Для переписки: Афанасьева Ольга Максимовна, н. с. лаборатории экспериментальной микробиологии, ФГБНУ "Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова", 105064, Москва, пер. Казенный М., д. 5А. +7 (495) 916-20-47, Факс: +7 (495) 916-20-47, kukina1994@mail.ru.* *©Афанасьева О. М. и др.*

Comparative analysis of pathogenicity factors of closely related Mitis group streptococci and surface protein-containing antigens isolated from them

OM Afanasyeva, IM Gruber, DS Vorobyev, OV Zhigunova, MN Dmitrieva*
Federal State Budget Institution of Science « Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia

Abstract

Relevance. *Mitis group streptococci (SMG) include 9 species of streptococci most frequently isolated from patients, including Streptococcus oralis and Streptococcus pneumoniae. The study of SMG shows not only differences but also overlaps in the genes encoding pathogenicity factors of S. pneumoniae and S. oralis. Earlier it was shown that antigens from S. pneumoniae serotype 6B induced cross-protective effect against virulent strains of S. pneumoniae. It was found that the experimental surface protein-containing fraction with molecular weight 30-100 kDa (PCF) from S. oralis has protective activity, stimulates in mice indicators of innate and adaptive immunity.* ***Objective:*** *to carry out a comparative analysis of pathogenicity factors of S. oralis and S. pneumoniae strains and protective activity of surface protein-containing antigens isolated from them.* ***Materials and methods.*** *The strains of S. oralis and S. pneumoniae serotype 6B Nos. 3353 and 1121 of different virulence were used. Experimental protein-containing antigens, in particular, PCF, were prepared from these strains. The protective activity of the obtained PCFs was evaluated in active protection experiments during intraperitoneal immunization and infection of BALB/c mice. Mass spectrometric study of PCF was carried out using UniProtKB database, taxon S. pneumoniae serotype 4 (strain ATCC BAA-334 / TIGR4.) Statistical processing of the results was carried out using parametric and nonparametric methods of comparison ($p<0.05$).* ***Results and discussion.*** *PCF from S. oralis has cross-species protective activity against virulent strains of S. pneumoniae of different serotypes, while PCF from S. pneumoniae strain 6B No. 3353 protects only against a virulent strain of the homologous serotype. Comparative analysis of genes encoding pathogenicity factors revealed differences: only in S. oralis genes encoding the synthesis of proteins promoting adhesion and biofilm formation (SspA, GtfD RlrA), and in S. pneumoniae strains - pore-forming toxin (Ply) and choline-binding protein (LytA) were identified. In the proteomic analysis of S. oralis and S. pneumoniae 6B No. 3353 PCFs, out of 673 identified proteins, 57 common proteins of most interest and 21 and 35 unique proteins, respectively, were selected for each PCF: in S. oralis PCFs, adhesion proteins were identified, as well as proteins related to metabolic systems and mediating the development of the infection process, while in S. pneumoniae PCFs, adhesion proteins were predominant those indirectly involved in the development of the infectious process, while the S. pneumoniae PCF is dominated by proteins related to the main pathogenicity factors.* ***Conclusions.*** *The surface protein-containing fraction 30 -100 kDa (PCF) isolated from a weakly virulent strain of S. oralis, belonging to the Mitis group streptococci, has interspecies protective activity against strains of closely related species - S. pneumoniae of different serotypes. PCF is capable of both preventing adhesion and colonization of pneumococcus and possibly playing the role of a natural adjuvant. In addition, it may be of interest to determine the protective effect of this antigen against other closely related SMG representatives. Both different and common genes encoding the synthesis of the main pneumococcal pathogenicity factors were identified in the strains, and unique proteins for each of them were determined by proteomic analysis of PCF.*

Keywords: *Mitis group streptococci, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus oralis, serotype-independent protective activity, virulence, experimental protein-containing preparation, surface protein-containing fraction, pathogenicity factors*
No conflict of interest to declare.

For citation: *Afanasyeva OM, Gruber IM, Vorobyev DS, et al. Comparative analysis of pathogenicity factors of closely related Mitis group streptococci and surface protein-containing antigens isolated from them. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2025;24(2): 24-32 (In Russ.). https://doi:10.31631/2073-3046-2025-24-2-24-32*

Введение

Streptococcus pneumoniae, относящийся к наиболее патогенным представителям стрептококков группы *Mitis* (Mitis Group Streptococci – SMG), является возбудителем ряда инвазивных и неинвазивных заболеваний человека, приводящих к высокому уровню смертности во всем мире. Введение пневмококковых полисахаридных и конъюгированных вакцин в Национальный календарь профилактических прививок и в программы вакцинации многих стран привело к формированию серотипспецифического иммунитета у населения и снижению заболеваемости пневмококковыми инфекциями, но в то же время повлияло на распространение невакцинных серотипов. Кроме того, существующие коммерческие вакцины оказались неэффективны в отношении бескапсульных (нетипируемых) штаммов [1].

Современная стратегия защиты от пневмококковых заболеваний нацелена на разработку вакцин, способных выработать серотипнезависимую защиту от широкого спектра серотипов пневмококков за счет стимуляции мукозального и системного иммунитета, что может обеспечить как снижение первичной назальной колонизации, так и инвазивных форм заболеваний [1–4].

Помимо *S. pneumoniae,* к наиболее часто выделяемым от больных видам SMG относят, в том числе, *Streptococcus mitis* и *Streptococcus oralis,* причем у этих видов установлены не только различия но и совпадения в генах, кодирующих факторы патогенности *S. pneumoniae* [5,6].

Ранее было показано, что секретируемые, внеклеточные и поверхностные антигены клеточной стенки грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов в разной степени активировали врожденный и адаптивный иммунитет и обладали

* *For correspondence: Afanasyeva Olga M., researcher of the Laboratory of experimental microbiology Federal State Budget Institution of Science «Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», +7 (495) 916-20-47, fax: +7 (495) 916-20-47, kukina1994@mail.ru.* *©Afanasyeva OM, et al.*

высокой протективной активностью [7]. В ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова был разработан метод получения белоксодержащих препаратов *S. pneumoniae* из клеточных стенок и культуральной среды трех музейных штаммов, выделенных от больных пневмонией и депонированных в 2016 г. в коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ (6В №296, 10А №297, 19F №298); было показано, что полученные из них белоксодержащие антигены индуцировали перекрестный протективный ответ (Патент РФ № 2601158) [8].

Следует отметить, что в 2022 г. при проведении мультилокусного сиквенстипирования* была предположительно установлена принадлежность штамма *S. pneumoniae* 6В №296 к другому близкородственному виду стрептококков группы *Mitis* – *S. oralis*, что в последующем было подтверждено с помощью MALDI-TOF MS анализа**. В связи с этим во всех публикациях до 2021 г. включительно этот штамм назван S. *pneumoniae* 6В № 296, а с 2022 г. – *Streptococcus oralis.* Было показано, что выделенные из этого штамма экспериментальные поверхностные белоксодержащие антигены – исходный водный экстракт, супернатант культуральной жидкости и поверхностная белоксодержащая фракция с молекулярной массой 30–100 кДа стимулируют у мышей показатели врожденного и адаптивного иммунитета. При этом БСФ из этого слабовирулентного штамма обладает протективной активностью в отношении вирулентных штаммов *S. pneumoniae* серотипов 3 и 6В [9,10].

Цель – сравнительный анализ факторов патогенности штаммов *S. oralis* и *S. pneumoniae* и протективной активности выделенных из них поверхностных белоксодержащих антигенов.

Материалы и методы

Экспериментальные поверхностные белоксодержащие антигены (ЭБСА) получали из штаммов стрептококков группы *Mitis*, выделенных от пациентов с неинвазивными и инвазивным пневмококковыми заболеваниями (табл. 1), выращенных до конца фазы экспоненциального роста в полусинтетической среде [11] при 5% CO_2. Из осажденных, инактивированных и высушенных диметилкетоном бактериальных клеток получали водный экстракт (В/Э), из которого с использованием фильтров Amicon®Ultra (Millipore, Ирландия) с порогом отсечения 100 кДа и 30 кДа выделяли поверхностную белоксодержащую фракцию с молекулярной массой (ММ) 30-100 кДа (БСФ) [10]. В полученных фракциях содержание белка определяли по методу Лоури [12].

Электрофоретическую подвижность и характеристику молекулярной массы ЭБСА *S. pneumoniae* и *S. oralis* изучали в вертикальном SDS-электрофорезе в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) при силе тока 20 мА до вхождения образцов в разделяющий гель, а затем – при 40 мА [13].

При **определении протективной активности** БСФ (в экспериментах активной защиты) мышей линии BALB/c массой 12–14 г иммунизировали внутрибрюшинно (в/бр) двукратно с интервалом 14 суток белоксодержащими антигенами, выделенными из *S. pneumoniae* 6В № 3353 и №1121 и *S. oralis*. Разовая иммунизирующая доза в опытной группе составляла 50 мкг белка/мышь в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида. Через 14 дней после иммунизации мышей опытной и контрольной (неиммунизированных) групп заражали в/бр соответствующими дозами вирулентных штаммов *S. pneumoniae* серотипов 6В № 1121 и 3 № 3 и № 101096. Животных содержали в условиях вивария в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными.

Молекулярно-генетическое исследование штаммов выполнено **методом полногеномного секвенирования** в геномном центре НИИ трансляционной медицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова***. При проведении сравнительного геномного анализа использовали полные геномы из открытого доступа базы данных PubMLST. Собранные контиги исследуемых геномов были упорядочены и ориентированы относительно эталонного генома изолята *S. pneumoniae* Hungary19A-6 (инвентарный номер GenBank GCA_001093665.1).

Идентификацию белкового состава БСФ проводили **методом масс-спектрометрического анализа******. Анализ проводился с использованием базы данных UniProtKB, таксон *S. pneumoniae* серотипа 4 (штамм ATCC BAA-334 / TIGR4.) Для определения функциональной аннотации идентифицированных белков использованы онлайн-сервис STRING-db (ver 11.5) и база данных KEGG (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Дизайн исследования одобрен этическим комитетом ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» (№3 от 06.03.2024).

Статистическую обработку результатов проводили с применением параметрических и непараметрических методов, как нами было описано ранее (LD_{50} определяли по общепринятой модифицированной формуле Кербера, использовали непараметрический критерий согласия Пирсона (χ^2); выживаемость мышей определяли по критерию значимости (Z)) [9]; индекс эффективности (ИЭ) рассчитывали по отношению LD_{50} иммунизированных мышей к неиммунизированным. Достоверность

* Мультилокусное сиквенстипирование выполнено в Центре лабораторной диагностики РДКБ РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ России (заведующий - д.м.н., проф. Н.А. Маянский)

** MALDI-TOF анализ проведен в лаборатории микробиологии условно патогенных бактерий ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (зав. лаб., к.б.н. А.В. Поддубиков)

*** Проведено к.м.н. Т.А. Савиновой (лаборатория молекулярной микробиологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова). Анализ полученных данных выполнен при консультировании к.м.н. Е. А. Бржозовской в Центре лабораторной диагностики РДКБ РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ России (заведующий - д.м.н., проф. Н.А. Маянский).

**** Проведено к.б.н. В. О. Шендер на базе ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

Таблица 1. Штаммы стрептококков группы Mitis, выделенные от пациентов с неинвазивными и инвазивными пневмококковыми заболеваниями
Table 1. Mitis group streptococcus strains isolated from patients with non-invasive and invasive pneumococcal disease

Название штамма, серотип/серогруппа Strain name, serotype/ serogroup	История штамма Strain history		
	№ исходный, выделен от No initial, isolate from	Депонирование Depositing	Источник Source
Streptococcus oralis* (*Streptococcus pneumoniae*) серотипа 6B *Streptococcus oralis** (*Streptococcus pneumoniae* serotype 6B)	(№ 123) от больного пневмонией from a pneumonia patient	(№ 296) в ЦЭК МИБП ФГБУ «НЦ ЭСМП» (No 296) in the Centre for Evaluation and Control of Finished Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP»	ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова** Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
Streptococcus pneumoniae серотипа 6B *Streptococcus pneumoniae* serotype 6*B*	№ 3353 от больного острым средним отитом from a patient with acute otitis media	№ 312 в ЦЭК МИБП ФГБУ «НЦ ЭСМП» No 312 in the Centre for Evaluation and Control of Finished Medicinal Products of the FSBI «SCEEMP»	ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова*** Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
Streptococcus pneumoniae серотипа 6B (ST***** 2138) *Streptococcus pneumoniae* serotype 6*B* (ST***** 2138*)*	№ 1121 из ликвора больного менингитом from the cerebrospinal fluid of a patient with meningitis		ФБУН ЦНИИЭ**** The Federal Budget Institute of Science Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor)

*Примечание: *Штамм депонирован как Streptococcus pneumoniae, ** лаборатория условно патогенных бактерий, *** лаборатория иммунохимической диагностики, **** лаборатория эпидемиологии менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов*
*****ST – сиквенс-тип.*
Note: The strain is deposited as Streptococcus pneumoniae, ** laboratory of opportunistic bacteria*
**** laboratory of immunochemical diagnostics, ***** Laboratory of Epidemiology of Meningococcal Infection and Purulent Bacterial Meningitis, ****** ST – Sequence Type.*

различий показателей рассматривалась как значимая при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

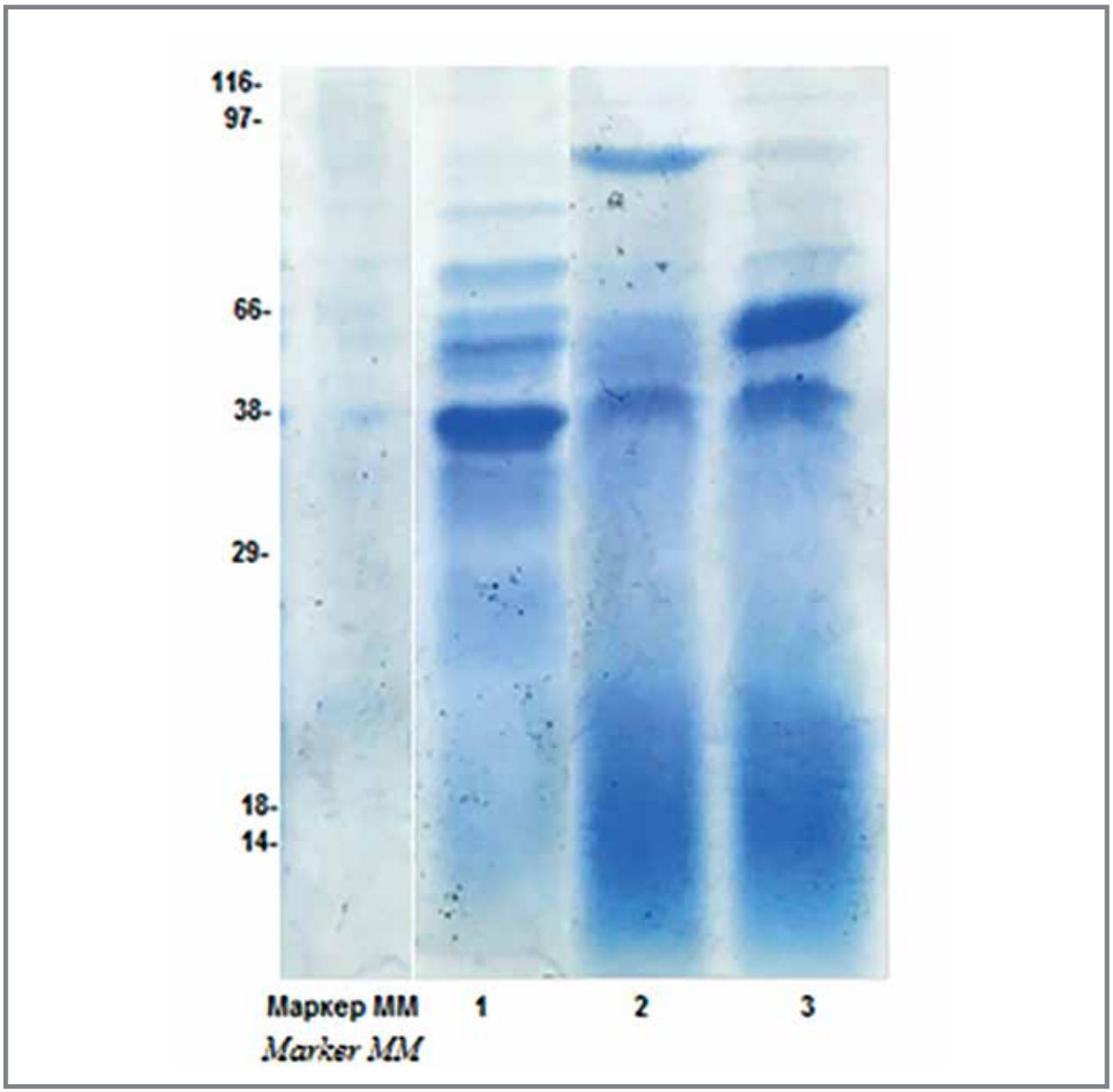
При электрофоретической характеристике исходных В/Э, полученных из трех различных по вирулентности штаммов, в 12% ПААГ показано основное разделение белков во всех препаратах В/Э в интервале от 30 до 100 кДа (рис. 1). Так, в В/Э из высоковирулентного штамма №1121 – LD_{50} (0,2–1,0)x10^6м.к. – основные белки выявлены на уровне 90 кДа, в то время как в В/Э из штамма №3353 с промежуточной вирулентностью – LD_{50} (0,2-2,2) x10^8м.к. – эти белки представлены слабой полосой, а мажорная – 60-50 кДа; в В/Э из штамма *S. oralis* (LD_{50} >10^9м.к.) основные белки отмечены с низкой ММ – ~38 кДа, а более слабые – 50–70 кДа. Таким образом, в В/Э из отличающихся по вирулентности штаммов показано наличие несовпадающих по ММ мажорных полос, что предполагает различие белкового состава в получаемых препаратах и может сказаться на их свойствах.

Ранее при определении протективной активности исходного водного экстракта (В/Э), полученного из оппозитных по вирулентности штаммов – *S. oralis* и *S. pneumoniae* 6B № 1121 была выявлена высокая выживаемость мышей, иммунизированных исходным В/Э из *S. oralis* ($p < 0,05$), по сравнению с группой контроля, в отличие от мышей, иммунизированных В/Э из *S. pneumoniae* 6B № 1121 [9].

Результаты сравнительного анализа протективной активности БСФ, выделенных из *S. oralis*, и из штамма с промежуточной вирулентностью – *S. pneumoniae* 6B № 3353, в экспериментах I–IV подтвердили протективную активность БСФ из *S. oralis* при заражении мышей высоковирулентными штаммами как серотипа 6B (I, II) так и двух вирулентных штаммов серотипа 3 (III и IV) (табл. 2). В то же время БСФ из штамма *S. pneumoniae* 6B № 3353 защищала только от высоковирулентного штамма того же серотипа (V) и не влияла на выживание мышей от вирулентного штамма № 10196 серотипа 3 (VI).

В связи с тем, что близкородственные штаммы стрептококков группы *Mitis*, выделенные при неинвазивных и инвазивных заболеваниях (пневмонии, остром среднем отите и менингите) обладают различной вирулентностью, как и выделенные из них БСФ – различной протективной активностью, в выделенных штаммах были определены гены, кодирующие синтез белков, ответственных за основные факторы патогенности [14]. Так, по результатам анализа полногеномного секвенирования было отмечено присутствие в штаммах общих генов, кодирующих синтез основных факторов патогенности пневмококка (холин-связывающих белков, белков, участвующих в адгезии и ряда ферментов, а также ABC транспортеров, осуществляющих транспорт различных субстратов, необходимых для жизнедеятельности бактериальной клетки). Наряду с этим, только в *S. oralis* были выявлены гены,

Рисунок 1. Электрофоретическая характеристика водных экстрактов из штаммов различной вирулентности
Figure 1. Electrophoretic characteristics of aqueous extracts from strains of different virulence



Примечание: 1 – из S. oralis, 2 – из S. pneumoniae 6B № 1121, 3 – из S. pneumoniae 6B № 3353.
Note: 1 – from S. oralis, 2 – from S. pneumoniae 6B N 1121, 3 – from S. pneumoniae 6B N 3353.

кодирующие белки, которые способствуют адгезии и образованию биопленок, распространенные среди комменсальных стрептококков, а также гены островка патогенности *rlrA*, связанного с синтезом белков пилей и колонизацией. В вирулентных штаммах *S. pneumoniae* 6B определены гены, регулирующие синтез основного фактора патогенности – пневмолизина, холин-связывающих белков – двух аутолизинов, плазминоген-связывающего белка и ферментов – гиалуронидазы и металлопротеазы цинка; эти факторы патогенности способствуют колонизации и инвазии, а также участвуют в иммунной эвазии. Только у высоковирулентного штамма № 1121 присутствуют гены, кодирующие белки (PspA и PspC), имеющие большое значение для вирулентности пневмококка [14].

Выявленные совпадения и различия генов *S. oralis* и *S. pneumoniae* №3353, кодирующих факторы патогенности изученных штаммов, и протективная активность полученных из них БСФ привели к необходимости идентификации их белкового состава. Масс-спектрометрическое исследование позволило в каждой БСФ выявить уникальные поверхностные белки, имеющие патогенетическое значение, и, возможно, они определяют различия, влияющие на протективные свойства. Так,

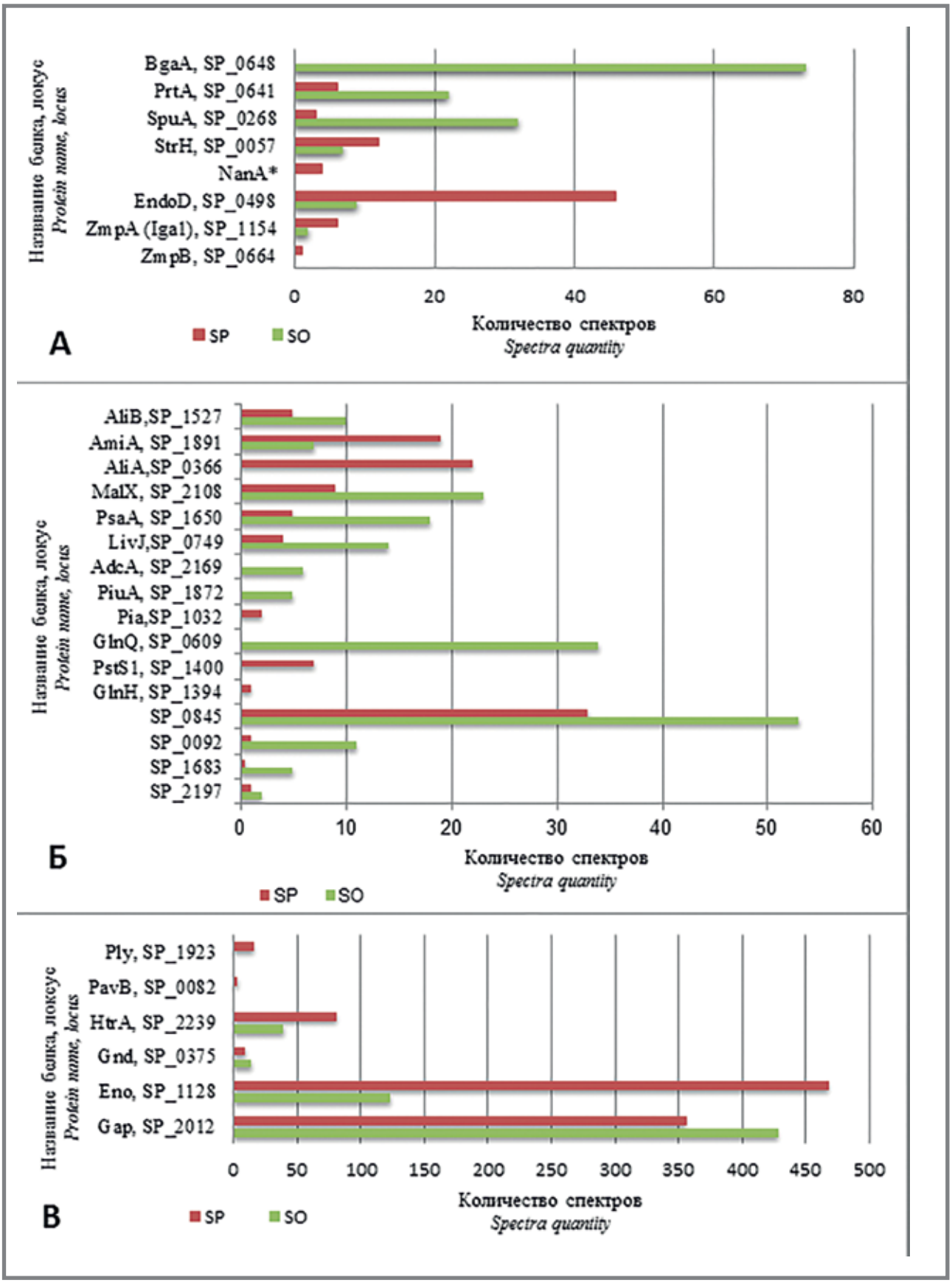
Таблица 2. Сравнительный анализ проективной активности БСФ, выделенных из S. oralis, и из штамма с промежуточной вирулентностью – S. pneumoniae 6B № 3353
Table 2. Comparative analysis of the protective activity of PCF isolated from S. oralis and from a strain with intermediate virulence – S. pneumoniae 6B No. 3353

Иммунизирующий антиген Immunizing antigen		Заражение: *S. pneumoniae*		Гибель мышей сутки: The death of mice per day:									Пало / заражено died / infected	LD_{50}, м.к. LD_{50} m.c. t_p*, p Z^{**} ***, $\chi 2^{****}$	ИЭ IF
из штамма from strain	препарат preparation	серотип № serotype No.	доза, м.к. dose, m.c.	1	2	3	4	5	6	7	8	10			
S. oralis	БСФ PCF	6B №1121	10^5				1				1		2/7	2,57x10^6 t_p=2,5 **p <0,05**	**9,52**
			10^6						1	1	1		3/10		
			10^7					1	1	1	1	2	6/10		
			10^8		1	1	1	1	1	1	2	1	9/10		
	Контроль Control		10^5					1	1	1	1	1	5/10	0,27x10^6	
			10^6			1	1	1	1	2	1		7/9		
			10^7			1	3	1		1	1		7/9		
			10^8				2		2		1	1	6/6		
	БСФ PCF		10^4					2	2	1			5/9	** Z=2,01 **p <0,05**	
	Контроль Control						2	3	3		1		9/9		
	БСФ PCF	3 №10196	10^3		6								6/10	5,01x10^3 t_p=2,98 p <0,05	**8,9**
			10^4		4								4/10		
			10^5		1	3							4/5		
	Контроль Control		10^3			6							6/8	0,56x10^3	
			10^4		5	5							10/10		
			10^5		3	2							5/5		
	БСФ PCF	3 №3	10^4		4								4/10	***Z =2,28, p <0,05; **** $\chi 2$ =5,95 p <0,02.	
	Контроль Control				5	5							10/10		
S. pneumoniae **6B №3353**	БСФ PCF	6B №1121	10^4		2	2		1					5/8	2,69x10^4 t_p=2,198 p <0,05	**4,79**
			10^5			2	2	1					5/9		
			10^6		1		1	2		3	1		8/9		
	Контроль Control		10^4				1	2	2		1		6/7	5,6*x10*^{3}	
			10^5		6	2	1						9/9		
			10^6		1	1	3	2			1		8/9		
	БСФ PCF	3 №10196	10^4	1	9								10/10	<10^4	
	Контроль Control				8	2							10/10	<10^4	

*Примечание. Достоверность различий между опытом и контролем: по критерию Стьюдента tp *по динамике выживаемости мышей, ** Z = 2,01, p < 0,05 при критическом значении >1,92; *** Z=2,28, p < 0,05 при критическом значении ≥2,086 (при 20 мышах в опыте); - по критерию согласия **** χ^2 =5,95 p < 0,02. м.к.- микробные клетки; ИЭ – индекс эффективности.*
*Note: Reliability of differences between the experiment and the control: by the dynamics of mouse survival * Z=2.01, p <0.05 with a critical value of >1.92; ** Z=2.28, p <0.05 with a critical value of ≥2.086 (with 20 mice in the experiment); by the goodness-of-fit criterion *** χ^2 =5.95 p <0.02. m.c. – microbial cells; EI – efficiency index.*

в двух БСФ идентифицировано 673 белка. По данным литературы, из белков, относящихся к основным факторам патогенности пневмококка и представляющих наибольший интерес, рассмотрены 113 белков [5,15 – 17], из которых только в БСФ *S. oralis* (SO) и *S. pneumoniae* 6B № 3353

Рисунок 2. Группы белков, выявленные в БСФ из SO и SP 3353: А – белки с LPxTG-мотивом; Б – ABC транспортеры, относящиеся к липопротеинам; В – неклассические поверхностные белки (NCSP)
Figure 2. Protein groups identified in the PCF from SO and SP 3353: A – protein with LPxTG motif; B – lipoprotein-associated ABC transporters; C – non-classical surface proteins (NCSP)



*Примечание: *в эталонном штамме TIGR4 белка нет по базе данных UniprotKB*
*Note: * the reference strain does not contain TIGR4 protein in the UniprotKB database*

(SP) отобрано соответственно 21 и 35 уникальных белка для каждого БСФ и 57 белков – общие для обоих БСФ.

Поверхностные белки рассматриваются как возможные факторы патогенности, и среди них выделяют основные семейства: белки с мотивом LPxTG, липопротеины (LP), холин-связывающие белки (CBP) и группу неклассических поверхностных белков (NCSP) [15]. Так, группа белков (более выраженные или отмечены в одной БСФ) включает белки:

- с мотивом LPxTG (рис. 2А) в БСФ SO – пуллуланаза A (SpuA), участвующая в иммунной эвазии, и адгезивные белки – сериновая протеаза (PrtA) и бета-галактозидаза (BgaA); в БСФ SP 3353 – участвующие в адгезии белки эндо-бета-N-ацетилглюкозаминидаза (EndoD) и нейраминидаза A (NanA);
- LP в основном представлены ABC транспортерами (рис. 2Б). Из них в БСФ SO определены белки, участвующие в инвазии (MalX – транспорт мальтозы) и адгезии (PsaA – переносчик марганца), а в БСФ SP 3353 идентифицированы транспортеры олигопептидов – белки, участвующие в адгезии (AliA) и в колонизации (AmiA);
- NCSP (рис. 2В) представлены в БСФ основными факторами патогенности: в БСФ SP 3353 – порообразующим токсином – пневмолизином (Ply), белком теплового шока – сериновой протеазой (HtrA), белками адгезии фибронектин-связывающим белком (PavB) и энолазой (Eno); в БСФ SO – белок глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (Gap) – адгезия и колонизация.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что поверхностная белоксодержащая фракция 30–100 кДа (БСФ), выделенная из слабовирулентного штамма *S. oralis*, относящегося к стрептококкам группы *Mitis*, обладает межвидовой протективной активностью в отношении штаммов близкородственного вида – *S. pneumoniae* различных серотипов. При разработке серотипнезависимой пневмококковой вакцины представляется целесообразным дальнейшее изучение экспериментального антигенного препарата – поверхностная белоксодержащая фракция ММ 30–100 кДа – в качестве компонента, способствующего как предупреждению адгезии и колонизации пневмококка, так и, возможно, участвующего в роли естественного адъюванта. Кроме того, может представлять интерес определение протективного действия этого антигена в отношении других близкородственных представителей SMG.

Литература

1. *Pichichero M.E. Pneumococcal whole-cell and protein –based vaccines: Changing the paradigm. Expert. Rev. Vaccines. 2017 Vol. 6, N12. P. 1181–1190.*
2. *Principi N., Esposito S. Development of pneumococcal vaccines over the last 10 years. Expert Opin. Biol. Ther. 2018. Vol. 18, N1. P. 7–17.*
3. *Masomian M., Ahmad Z., Gew L.T., et al. Development of Next Generation Streptococcus pneumoniae Vaccines Conferring Broad Protection. Vaccines (Basel). 2020. Vol. 8, N1. P. 132.*
4. *Грубер И. М., Кукина О. М., Егорова Н. Б. и др. Различные технологии получения пневмококковых иммуногенов: определение новых подходов к их разработке. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2021. Т. 20, № 1. С. 76–91.*
5. *Kilian M., Tettelin H. Identification of Virulence-Associated Properties by Comparative Genome Analysis of Streptococcus pneumoniae, S. pseudopneumoniae, S. mitis, Three S. oralis Subspecies, and S. infantis. mBio. 2019. Vol. 10, № 5. P. e01985–19.*
6. *Joyce L.R., Youngblom M.A., Cormaty H., et al. Comparative Genomics of Streptococcus oralis Identifies Large Scale Homologous Recombination and a Genetic Variant Associated with Infection. mSphere. 2022. Vol. 7, № 6. P. e0050922.*
7. *Грубер И. М., Егорова Н. Б., Асташкина Е. А. и др. Иммуногенные свойства клеточных и внеклеточных белоксодержащих антигенов Staphylococcus aureus. Журн. микробиол. 2019. Т. 1, № 1. С.29–36.*
8. *Егорова Н. Б., Курбатова Е. А., Воробьев Д. С. и др. Штаммы вида Streptococcus pneumoniae (варианты) и способ получения из них протективной белоксодержащей фракции, обладающей внутривидовой иммуногенной активностью. Патент РФ на изобретение № 2601158. 27.10.2016. Бюл. №30. Доступно на: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002601158_20161027_C1_RU.*
9. *Кукина О. М., Грубер И. М., Ахматова Н. К. и др. Серотипнезависимая протективная активность экспериментальных белоксодержащих препаратов Streptococcus pneumoniae, полученных из свежевыделенных и музейных штаммов. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2020. Т. 19, № 1. С. 35–42.*
10. *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. Т. 19, № 3. С. 21–27.*
11. *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. Т. 89, № 2. С.12–17.*
12. *Геворгиз Р. Г., Железнова С. Н., Нехорошев М. В. Количественное определение массовой доли суммарных белков в воздушно-сухой биомассе микроводорослей методом Лоури: учебно-методическое пособие. РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского. Севастополь, 2017.*
13. *Воробьев Д. С., Сидоров А. В., Калошин А. А. и др. Получение рекомбинантной формы белка пневмолизина Streptococcus pneumoniae. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022. Т. 174, № 12. С. 723–727.*
14. *Афанасьева О. М., Грубер И. М., Бржозовская Е. А., Асташкина Е. А. Факторы патогенности близкородственных стрептококков группы Mitis разной вирулентности // Сборник Трудов XI Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2023». Москва: АО «САЙЕНС МЕДИА ПРОДЖЕКТС», 2023.*
15. *Pérez-Dorado I., Galan-Bartual S., Hermoso J.A. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. Mol. Oral Microbiol. 2012. Vol. 27, № 4. – P. 221–245.*
16. *Gámez G., Castro A., Gómez-Mejia A., et al. The variome of pneumococcal virulence factors and regulators. BMC Genomics. 2018. Vol. 19, № 1. C.10.*
17. *Weiser J.N., Ferreira D.M., Paton J.C. Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. Nat. Rev. Microbiol. 2018. Vol. 16, № 6. P. 355–367.*

References

1. *Pichichero ME. Pneumococcal whole-cell and protein –based vaccines: Changing the paradigm. Expert. Rev. Vaccines. 2017;6(12):1181–1190. doi: 10.1080/14760584.2017.1393335*
2. *Principi N, Esposito S. Development of pneumococcal vaccines over the last 10 years. Expert Opin. Biol. Ther. 2018;18(1):7–17. doi: 10.1080/14712598.2018.1384462*
3. *Masomian M, Ahmad Z, Gew LT, et al. Development of Next Generation Streptococcus pneumoniae Vaccines Conferring Broad Protection. Vaccines (Basel). 2020;8(1):132. doi: 10.3390/vaccines8010132*
4. *Gruber I.M., Kukina O.M., Egorova, N.B., Zhigunova O.V. Different Technologies for Obtaining Pneumococcal Immunogens. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2021;20(1):76–91 (In Russ.). doi: 10.31631/2073-3046-2021-20-1-76-91*

5. *Kilian M, Tettelin H. Identification of Virulence-Associated Properties by Comparative Genome Analysis of Streptococcus pneumoniae, S. pseudopneumoniae, S. mitis, Three S. oralis Subspecies, and S. infantis. mBio. 2019;10(5):e01985–19. doi:10.1128/mBio.01985-19*
6. *Joyce LR, Youngblom MA, Cormaty H, et al. Comparative Genomics of Streptococcus oralis Identifies Large Scale Homologous Recombination and a Genetic Variant Associated with. mSphere. 2022;7(6):e0050922. doi:10.1128/msphere.00509-22*
7. *Gruber IM, Egorova NB, Astashkina EA, et al. Immunogenic properties of cellular and extracellular protein-containing antigens of Staphylococcus aureus. Zh. Mikrobiol. 2019;1(1): 29–36 (In Russ).*
8. *Egorova NB, Kurbatova EA, Vorobev DS, et al. Strains of Streptococcus pneumoniae (versions) and method of producing protective protein fraction, possessing intraspecific immunogenic activity. Patent RUS № 2601158. 27.10.2016. Byul. №30. Available at: https://rusneb.ru/catalog/000224_000128_0002601158_20161027_C1_RU (In Russ).*
9. *Kukina OM, Gruber IM, Akhmatova NK, et al. Experimental Protein-Containing Preparations Streptococcus pneumoniae, Obtained from Fresh Isolated Strains and Museum. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2020; 19(1): 35–42 (In Russ.). doi: 10.31631/2073-3046-2020-19-1-35-42*
10. *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). doi: 10.31631/2073-3046-2020-19-3-21-27*
11. *Grischenko NV, Tokarskaya MM, Kalina NG, et al. Influence of nutrient medium composition on the production of capsule polysaccharide by Streptococcus pneumonia 19A serotype. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2012; 2: 12–7 (In Russ).*
12. *Gevorgiz. R.G., Zheleznova S.N., Nekhoroshev M.V.. Quantitative determination of the mass fraction of total proteins in dry biomass of microalgae by the Lowry method : educational and methodological manual / RAS, Kovalevsky Institute of Marine Biological Research. Sevastopol, 2017.*
13. *. Vorob'ev D. S., Sidorov A. V., Kaloshin A. A., et al. Preparation a recombinant form of pneumolysin protein from Streptococcus pneumoniae. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2022;174(12):723-727. doi: 10.47056/0365-9615-2022-174-12-723-727*
14. *Afanasyeva OM, Gruber IM, Brzhozovskaya EA, Astashkina EA. Faktory patogennosti blizkorodstvennyh streptokokkov gruppy Mitis raznoj virulentnosti. Sbornik Trudov XI Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii «Molekulyarnaya diagnostika 2023». Moskva: AO «SAJENS MEDIA PRODZhEKTS», 2023. (In Russ).*
15. *Pérez-Dorado I, Galan-Bartual S, Hermoso JA. Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. Mol Oral Microbiol. 2012;27(4):221–245. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00655.x*
16. *Gámez G, Castro A, Gómez-Mejia A, et al. The variome of pneumococcal virulence factors and regulators. BMC Genomics. 2018;19(1):10. Published 2018 Jan 3. doi:10.1186/s12864-017-4376-0*
17. *Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. Nat Rev Microbiol. 2018;16(6):355–367. doi355–367. doi:10.1038/s41579-018-0001-8*

Об авторах

- **Ольга Максимовна Афанасьева** – научный сотрудник лаборатории экспериментальной микробиологии, ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва. +7 (495) 916-20-47, kukina1994@mail.ru. ORCID 0000-0003-0875-4141.
- **Ирина Мироновна Грубер** – д. м. н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной микробиологии, ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва. +7 (495) 916-20-47, igruber_instmech@mail.ru. ORCID 0000-0002-1922-4640.
- **Денис Сергеевич Воробьев** – к. м. н., заведующий лабораторией экспериментальной микробиологии, ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва. +7 (495) 916-20-47, vorobievdenis@yandex.ru. ORCID 0000-0002-1926-8803.
- **Ольга Валерьевна Жигунова** – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной микробиологии, ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва. +7 (495) 916-20-47, kileva@mail.ru. ORCID 0000-0002-3958-6219.
- **Мария Николаевна Дмитриева** – старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной микробиологии, ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва. +7 (495) 916-20-47, dmn290368@mail.ru. ORCID 0009-0004-1951-165X.

Поступила: 19.01.2025. Принята к печати: 20.02.2025.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Olga M. Afanasyeva** – Researcher of the Laboratory of experimental microbiology of the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. +7 (495) 916-20-47, kukina1994@mail.ru. ORCID 0000-0003-0875-4141.
- **Irina M. Gruber** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher of the Laboratory of Experimental Microbiology of the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. +7 (495) 916-20-47, igruber_instmech@mail.ru. ORCID 0000-0002-1922-4640.
- **Denis S. Vorobyev** – Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Experimental Microbiology of the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. +7 (495) 916-20-47, vorobievdenis@yandex.ru. ORCID 0000-0002-1926-8803.
- **Olga V. Zhigunova** – Junior Researcher at the Laboratory of Experimental Microbiology of the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. +7 (495) 916-20-47, kileva@mail.ru. ORCID 0000-0002-3958-6219.
- **Maria N. Dmitrieva** – Senior Researcher at the Laboratory of Experimental Microbiology of the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. +7 (495) 916-20-47, dmn290368@mail.ru. ORCID 0009-0004-1951-165X.

Received: 19.01.2025. Accepted: 20.02.2025.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.