

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-4-59-65>

Протективная активность смесей пневмококковых антигенов при инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3

Д.С. Воробьев^{1,2}, М.М. Токарская¹, С.А. Барановская¹, Е.А. Стефутушкина^{1,2}, О.М. Афанасьева¹, Е.А. Асташкина¹, О.В. Жигунова¹, Ю.В. Волох¹, А.Ю. Леонова¹, Е.С. Петухова¹, И.Б. Семенова¹, Д.Н. Нечаев², Е.О. Кравцова², Н.Н. Овечко¹, Н.Е. Ястребова¹, И.М. Грубер¹, Н.А. Михайлова¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5а;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Денис Сергеевич Воробьев vorobievdennis@yandex.ru

Введение. Пневмококковые заболевания сохраняют актуальность для всего мира. С одной стороны, это обусловлено высокой распространенностью пневмококка, а с другой – ростом антибиотикорезистентных штаммов и постоянной сменой клинически значимых серотипов возбудителя.

Цель исследования – изучение протективной активности смеси пневмококковых антигенов.

Материалы и методы. Для выполнения работы использовали препараты капсульного полисахарида (КПС) пневмококка серотипа 3; белоксодержащую фракцию (БСФ), полученную из водного экстракта клеток *Streptococcus pneumoniae* серотипа 6В; рекомбинантный пневмолизин (rPly). Мышей иммунизировали внутривентрально двукратно с интервалом 14 дней смесями бактериальных антигенов: КПС + БСФ; КПС + rPly; БСФ + rPly. Для оценки протективной активности исследуемых препаратов животных после двукратной иммунизации заражали внутривентрально *S. pneumoniae* серотипа 3. Для изучения влияния смесей бактериальных препаратов на инфекционный процесс в легких иммунизированных мышей интраназально заражали штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3. Гуморальный иммунный ответ изучали с помощью определения IgG-антител методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты. Смесь КПС + rPly защищала мышей от внутривентрального заражения пневмококком серотипа 3 независимо от заражающей дозы. Иммунизация смесями КПС + БСФ или КПС + rPly влияла на достоверное уменьшение количества высеваемых бактериальных клеток из легких в течение всего периода наблюдения (72 ч) по сравнению с контролем. Введение животным смесей бактериальных антигенов КПС + БСФ, КПС + rPly или БСФ + rPly приводило к достоверному повышению уровня антител ко всем антигенам, однако наиболее высокие уровни IgG-антител определяли к БСФ и rPly.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что разные антигенные препараты в смесях влияют на различные механизмы активации иммунитета.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, капсульный полисахарид, белоксодержащая фракция, рекомбинантный пневмолизин, смеси антигенных препаратов

Для цитирования: Воробьев Д.С., Токарская М.М., Барановская С.А. и др. Протективная активность смесей пневмококковых антигенов при инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипа 3. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):59–65. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-59-65.

Protective activity of mixtures of pneumococcal antigens in infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3

Denis S. Vorobyev^{1,2}, Marina M. Tokarskaya¹, Sofia A. Baranovskaya¹, Elena A. Stefutushkina^{1,2}, Olga M. Afanasyeva¹, Elena A. Astashkina¹, Olga V. Zhigunova¹, Yuri V. Volokh¹, Anna Yu. Leonova¹, Ekaterina S. Petukhova¹, Inna B. Semenova¹, Dmitriy N. Nechaev², Elena O. Kravtsova², Nikolay N. Ovechko¹, Natalia E. Yastrebova¹, Irina M. Gruber¹, Natalia A. Mikhailova¹

¹I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5a Maly Kazenny per., 105064 Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya St., 119991 Moscow, Russia

Contacts: Denis Sergeevich Vorobyev vorobievdenis@yandex.ru

Introduction. Pneumococcal diseases remain relevant for the whole world. On the one hand, this is due to the high prevalence of pneumococcus and the other hand, the growth of antibiotic-resistant strains and the constant change of clinically significant serotypes of the pathogen.

The aim of the research was to study of the protective activity of a mixture of pneumococcal antigens.

Material and methods. We used preparations of a capsular polysaccharide (CPS) obtained from *Streptococcus pneumoniae* serotype 3; protein-containing fraction (PCF) obtained from an aqueous extract of cells of *S. pneumoniae* serotype 6B; recombinant pneumolysin (rPly). Mice were immunized intraperitoneally twice with an interval of 14 days with mixtures of bacterial antigens: CPS + PCF; CPS + rPly; PCF + rPly. To assess the protective activity of the studied drugs after double immunization animals were infected intraperitoneally with *S. pneumoniae* serotype 3. To study the effect of mixtures of bacterial preparations on the infectious process in the lungs immunized mice were infected with *S. pneumoniae* serotype 3. The humoral immune response was studied with IgG using the method of ELISA.

Results. The CPS + rPly mixture protected mice from intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 3 regardless of the infecting dose. Immunization with CPS + PCF or CPS + rPly mixtures influenced a significant decrease the number of seeded bacterial cells from lungs during the entire observation period (72 h) compared to the control. Administration of mixtures of bacterial antigens of CPS + PCF, CPS + rPly or PCF + rPly to animals led to a significant increase of the level of antibodies to all antigens, however, the highest levels of IgG were determined to PCF and rPly.

Conclusion. The results obtained suggest that different antigenic drugs in mixtures affect different mechanisms of immunity activation.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, capsular polysaccharide, protein-containing fraction, recombinant pneumolysin, mixtures of antigenic drugs

For citation: Vorobyev D.S., Tokarskaya M.M., Baranovskaya S.A. et al. Protective activity of mixtures of pneumococcal antigens in infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4):59–65. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-59-65.

Введение

Пневмококковые заболевания сохраняют актуальность для всего мира. *Streptococcus pneumoniae* является одним из ключевых бактериальных патогенов, вызывающих средний отит, внебольничную пневмонию, сепсис и менингит [1]. Необходимость разработки пневмококковых препаратов обусловлена постоянной сменой клинически значимых серотипов *S. pneumoniae*, а также ростом числа антибиотикорезистентных штаммов возбудителя [2–4]. В настоящее время в нашей стране используются зарубежные полисахаридные и конъюгированные пневмококковые вакцины [5]. С одной стороны, есть положительный опыт применения данных вакцин в Европе и Северной Америке [6], с другой стороны, реальная польза пневмококковых вакцин в Российской Федерации не так ясна, так как нет постоянного эпидемиологического мониторинга за пневмококковой инфекцией. Конъюгированные вакцины расширяют показания для их использования: дети младше 5 лет и пожилые люди старше 65 лет [7]. Однако сама технология конъюгирования является трудоемкой [8], что, на наш взгляд, значительно удорожает и усложняет производство таких вакцин. Все вышеперечисленное ограничивает возможности современных пневмококковых вакцин и делает востребованной разработку более доступных, но не менее эффективных пневмо-

кокковых вакцин. Многообещающей является разработка вакцин, состоящих из смеси протективных антигенов пневмококка: капсульного полисахарида и белков микроба. Ранее нами была изучена и показана перспективность применения нативных белоксодержащих антигенов пневмококка при заражении гомологичными и гетерологичными штаммами [9–13].

Цель исследования — изучение протективной активности смеси пневмококковых антигенов.

Материалы и методы

Мыши линии BALB/c, самцы массой 14–16 г, были получены из питомника ООО «СМК СТЕЗАР» (г. Владимир). Животных содержали в условиях вивария ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова). Все эксперименты на мышах проводили в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217-2014).

Штаммы, использованные в работе: штамм № 10196 *S. pneumoniae* серотипа 3 (штамм депонирован под номером 316 в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России); штамм № 296 *S. pneumoniae* серотипа 6B.

Капсульный полисахарид (КПС) получали из *S. pneumoniae* серотипа 3, выращенного в полусинтетической

питательной среде. Этапы выделения включали: ультрафильтрацию и концентрирование, обработку ферментами, фенольную депротеинизацию и диализ. Белоксодержащую фракцию (БСФ) (30–100 кДа) получали при помощи фильтров Amicon Ultra из водного экстракта инактивированных ацетоном клеток *S. pneumoniae* серотипа 6В [13]. Рекомбинантный пневмолизин (rPly) предоставлен сотрудниками ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, для его получения было использовано оборудование центра коллективного пользования ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Для иммунизации мышей использовали смеси вышеперечисленных препаратов в соответствующих дозах/мышь. Смесь 1: КПС (5 мкг) + БСФ (50 мкг); смесь 2: КПС (5 мкг) + rPly (25 мкг); смесь 3: БСФ (50 мкг) + rPly (25 мкг). Животных иммунизировали внутрибрюшинно двукратно с интервалом 14 дней. Разовую иммунизирующую дозу вводили в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл. В качестве контрольной группы использовали intactных мышей, которым вводили физиологический раствор. Через 2 нед после последней иммунизации собирали индивидуальные мышинные сыворотки (в группе $n = 5$).

Для оценки гуморального иммунного ответа использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа. С целью получения иммуносорбентов лунки отдельных полистирольных пластин (Greiner, Германия) сорбировали каждым из препаратов: КПС, БСФ и rPly. Препараты растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,2–7,4 до концентрации 2 мкг/мл. Используя полученные иммуносорбенты, сыворотки животных анализировали согласно описанной методике [14]. Результаты выражали в условных единицах (J), рассчитанных по формуле:

$$J = \frac{ОП_{AC}}{ОП_{K-} + 0,25} \times 100,$$

где ОП_{AC} — оптическая плотность в лунке с анализируемой сывороткой, ОП_{K-} — оптическая плотность в лунке с отрицательной контрольной сывороткой. В качестве отрицательного контроля (K⁻) использовали сыворотки неиммунизированных мышей.

Для исследования протективной активности смесей препаратов иммунизированных мышей заражали внутрибрюшинно штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3 тремя дозами в диапазоне от 10³ до 10⁵ микробных клеток (м. кл.)/0,5 мл физиологического раствора через 14 дней после 2-й иммунизации. Все заражающие дозы были абсолютно летальными для мышей.

Для изучения влияния смесей препаратов на развитие инфекционного процесса иммунизированных

мышей интраназально заражали штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3 в дозе 10⁷ м. кл. в 10 мкл физиологического раствора. Контрольной группе вводили физиологический раствор. Количество животных для оценки высеваемости бактерий из легких равнялось 5 в каждой временной точке для каждой группы. Вскрытие животных проводили через 4, 24, 48 и 72 ч. Стерильно отобранные легкие мышей гомогенизировали, полученную взвесь титровали и мерно высевали на чашки Петри с кровяным агаром. Через 18–20 ч культивирования в термостате при температуре 37 °C и 5 % CO₂ производили подсчет выросших колоний бактерий, после чего пересчитывали число бактерий на мышь [15].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel, Statistica 10 и Biostat. Различия в выживаемости мышей в течение заданного срока рассчитывали при сравнении 2 кривых выживаемости согласно методу, описанному С.А. Гланцем [16].

Результаты

При изучении протективной активности смесей препаратов КПС + БСФ, КПС + rPly, БСФ + rPly было выявлено, что от заражения вирулентным штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3 мышей защищает только смесь КПС + rPly (достоверные различия по сравнению с контролем, $p < 0,001$; рис. 1). Интересен тот факт, что защита формировалась независимо от заражающей дозы пневмококка (испытывали 3 заражающие дозы в диапазоне от 10³ до 10⁵ м. кл.; на рис. 1 представлены результаты только для средней заражающей дозы). В то же время смеси КПС + БСФ или БСФ + rPly не защищали животных от пневмококковой инфекции при использовании любой заражающей дозы.

Исследование иммунного ответа у иммунизированных мышей выявило значительное повышение уровня специфических антител к rPly и БСФ при незначительном повышении уровня антител к КПС (рис. 2). При использовании смеси КПС + БСФ отмечали повышение уровня антител к БСФ в 1,65 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При использовании смеси КПС + rPly наблюдали повышение в 13 раз уровня антител к rPly (но не к КПС) по сравнению с сывороткой контрольной группы мышей ($p < 0,001$). Иммунизация животных смесью БСФ + rPly вызывала повышение уровня антител как к rPly — в 10 раз, так и к БСФ — в 7,5 раза по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Для оценки влияния смесей антигенных препаратов на развитие инфекционного процесса использовали также модель интраназального заражения мышей после двукратной иммунизации с последующим определением количества бактерий, высеваемых из

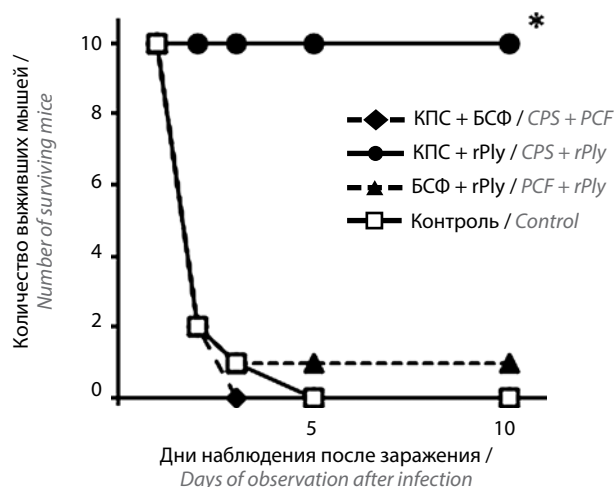


Рис. 1. Выживаемость мышей при внутрибрюшинном заражении *S. pneumoniae* серотипа 3 в дозе 10^4 микробных клеток/0,5 мл физиологического раствора на мышшь; *достоверность различий между опытом и контролем ($p < 0,001$) при сравнении кривых выживаемости по С.А. Глацу. Здесь и на рис. 2, 3: КПС – капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 3; БСФ – белоксодержащая фракция из водного экстракта клеток *S. pneumoniae* серотипа 6В; rPly – рекомбинантный пневмоллизин

Fig. 1. Survival of mice with intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 3 in a dose 10^4 microbial cells/0,5 ml physical solution per mouse; *the reliability of the difference between the experiment and the control ($p < 0.001$) when comparing the survival curves according to S.A. Glants. Here and on fig. 2, 3: CPS – capsular polysaccharide obtained from *S. pneumoniae* serotype 3; PCF – protein-containing fraction obtained from an aqueous extract of cells of *S. pneumoniae* serotype 6В; rPly – recombinant pneumolysin

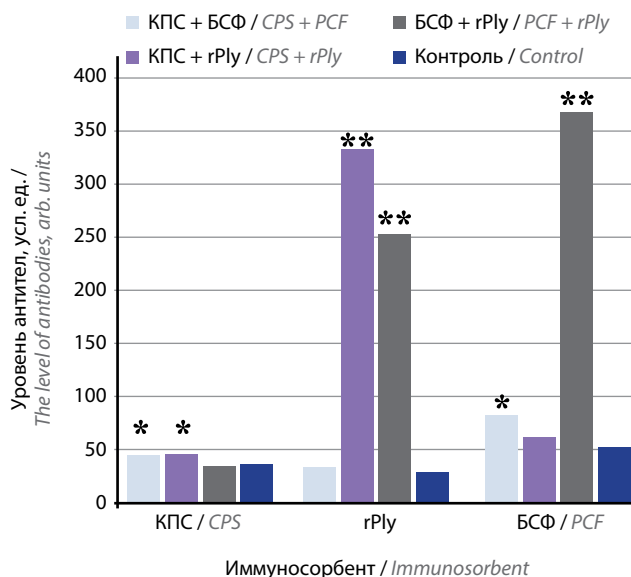


Рис. 2. Уровень IgG-антител к антигенам пневмококковых смесей в сыворотках мышей; *достоверность различий между опытом и контролем ($p < 0,05$); **достоверность различий между опытом и контролем ($p < 0,001$)

Fig. 2. The level of IgG antibodies to antigens of pneumococcal mixtures in the sera of mice; *reliability of the difference between experience and control ($p < 0.05$); **reliability of the difference between experience and control ($p < 0.001$)

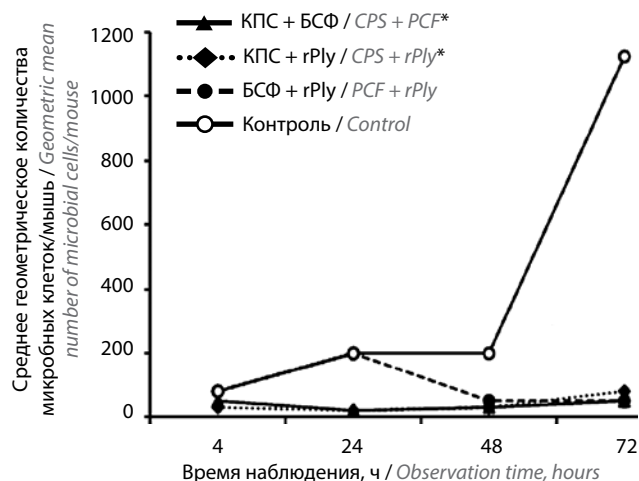


Рис. 3. Зависимость количества бактерий в легких мышей от времени наблюдения при интраназальном заражении *S. pneumoniae* серотипа 3; *достоверность различий между опытом и контролем в течение 72 ч ($p < 0,05$)

Fig. 3. Dependence of the number of bacteria in the lungs of mice on the observation time during intranasal infection with *S. pneumoniae* serotype 3; *reliability of the difference between experiment and control within 72 hours ($p < 0.05$)

легких, в зависимости от времени наблюдения. При использовании данной модели отмечали следующие результаты (рис. 3). Через 4 ч после заражения между группами мышей, получавших смеси препаратов, и контрольными животными достоверных различий не было выявлено. Через 24 ч после заражения наблюдали одинаковое небольшое увеличение количества бактерий в легких – до 2×10^2 (20 : 2000) в группе контроля и группе мышей, иммунизированных смесью БСФ + rPly, в то время как в опытных группах, иммунизированных смесью КПС + БСФ или КПС + rPly (20 : 20), отмечали снижение количества микробов, высеянных из легочной ткани. Через 48 ч наблюдения количество бактерий в легких в группе контроля не менялось, в то время как в группе животных, получавших БСФ + rPly, отмечали небольшое снижение числа микробов в легких по сравнению с предыдущей временной точкой. Через 72 ч наблюдения регистрировали значительное увеличение количества бактерий в легких мышей контрольной группы – до $1,1 \times 10^3$ (20 : 20000), в то время как во всех остальных опытных группах отмечали в 10 раз меньшее количество микробов, высеянных из легких. Однако достоверные различия с контролем были выявлены только в группах КПС + БСФ и КПС + rPly ($p < 0,05$).

Обсуждение

При анализе представленных данных обращает на себя внимание результат, полученный при использовании смеси антигенных препаратов КПС и rPly. Анализ протективной активности смеси КПС + rPly показал 100 % выживаемость мышей

при внутрибрюшинном заражении по сравнению с контрольной и другими опытными группами (КПС + БСФ, БСФ + rPly), в которых защита не формировалась, что может быть связано с недостаточной дозой антигенов в смесях. Ранее нами было показано, что трехкратная иммунизация мышей rPly защищает 67 % животных от внутрибрюшинного заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 по сравнению с контролем [17], однако убедительных экспериментальных данных по протективной активности КПС серотипа 3 нет, как, впрочем, нет опубликованных разработчиками полисахаридных и конъюгированных пневмококковых вакцин данных по иммуногенности отдельных КПС. Таким образом, препараты в смеси КПС + rPly, вероятно, действуют синергично по отношению друг к другу, влияя на формирование более выраженной защиты.

Стоит отметить, что при анализе уровня сывороточных антител в сыворотках животных наблюдали достоверное повышение IgG-антител в большинстве опытных групп по сравнению с контролем. Однако более высокие уровни антител определяли к БСФ и рекомбинантному белку, в то время как к КПС отмечали незначительное повышение уровня антител [18]. Примечательно, что при использовании антигенных смесей КПС + rPly и БСФ + rPly уровни антител к rPly или к БСФ увеличивались примерно в 1 интервале, в то время как при применении смеси КПС + БСФ уровень антител к БСФ повышался незначительно. Обнаружение более высокого уровня антител к rPly при иммунизации смесями КПС + rPly или БСФ + rPly, вероятно, связано с тем, что происходит индукция синтеза антител к рекомбинантному белку независимо от 2-го компонента смеси (КПС или БСФ) и, возможно, обусловлено оптимальным взаимодействием rPly как с КПС, так и с БСФ. В дальнейшей работе мы планируем использовать для иммунизации смесь антигенов, состоящую из 2 белков (БСФ и rPly) и КПС, что, предположительно, позволит усилить гуморальный иммунный ответ и протективную активность.

Развитие инфекционного процесса, контролируемого по высевам бактерий из легких, достоверно отличалось только в группах мышей, иммунизированных смесью КПС + БСФ или КПС + rPly, по сравнению с контролем. Однако, независимо от применяемых смесей бактериальных антигенов, происходило уменьшение количества высеваемых микробов из легких к концу периода наблюдения (72 ч) во всех опытных группах животных по сравнению с контрольной группой, в которой отмечали значительное увеличение числа высеваемых бактериальных клеток к окончанию эксперимента, что, на наш взгляд, свидетельствует о протективной активности используемых смесей. По-видимому, увеличение сроков наблюдения за высевам микробов из легких позволит подтвердить эффективность бактериальных смесей в защите от пневмококковой инфекции.

Заключение

Полученные результаты позволяют предположить, что разные антигенные препараты в смесях влияют на различные механизмы активации иммунитета и вместе с тем дополняют друг друга. Так, например, защита мышей, иммунизированных смесью КПС + rPly, от внутрибрюшинного заражения пневмококком согласуется с высоким уровнем антител к rPly в сыворотках животных. Однако на развитие инфекционного процесса и формирование защиты, вероятно, влияет не только гуморальное звено иммунитета, но и клеточное, что частично подтверждается опытом по высевам бактерий из легких мышей при интраназальном заражении пневмококком. Только смеси бактериальных антигенов пневмококка, содержащие и КПС, и белок (КПС + БСФ и КПС + rPly), препятствовали развитию инфекционного процесса в легких в течение 72 ч наблюдения. Последующее изучение механизмов клеточного иммунитета в модели высева бактерий из легких позволит оценить защитную роль клеточных факторов в элиминации внеклеточных патогенов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kim L., McGee L., Tomczyk S., Beall B. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and postconjugate vaccine eras: a United States perspective. Clin Microbiol Rev 2016;29(3):525–52. DOI: 10.1128/CMR.00058-15.
- Brooks L.R.K., Mias G.I. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. Front Immunol 2018;9:1366. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01366.
- Nishimoto A.T., Rosch J.W., Tuomanen E.I. Pneumolysin: pathogenesis and therapeutic target. Front Microbiol 2020;11:1543. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01543.
- Weiser J.N., Ferreira D.M., Paton J.C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. Nat Rev Microbiol 2018;16(6):355–67. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8.
- Masomian M., Ahmad Z., Gew L.T., Poh C.L. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. Vaccines (Basel.) 2020;8(1):132. DOI: 10.3390/vaccines8010132.
- Cillo niz C., Amaro R., Torres A. Pneumococcal vaccination. Curr

- Opin Infect Dis 2016;29(2):187–96. DOI: 10.1097/qco.0000000000000246.
7. Briles D.E., Paton J.C., Mukerji R. et al. Pneumococcal Vaccines. Microbiol Spectr 2019;7(6). DOI: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0028-2018.
 8. Ginsburg A.S., Alderson M.R. New conjugate vaccines for the prevention pneumococcal disease in developing countries. Drugs Today 2011;47(3):207–14. DOI: 10.1358/dot.2011.47.3.1556471.
 9. Ванеева Н.П., Воробьев Д.С., Грищенко Н.В. и др. Изучение перекрестной активности антигенных препаратов *Streptococcus pneumoniae*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2012;5:36–42. [Vaneeva N.P., Vorobyev D.S., Grischenko N.V. et al. Study of cross-activity *Streptococcus pneumoniae* antigen preparations. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2012;5:36–42. (In Russ.)].
 10. Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Волох Ю.В. и др. Изучение протективной активности белоксодержащего комплекса антигенов *Streptococcus pneumoniae* в гомологичной системе. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2013;1:21–6. [Vorobyev D.S., Semenova I.B., Volokh Yu.V. et al. Study of protective activity of *Streptococcus pneumoniae* protein-containing antigen complex in homologous system. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2013;1:21–6. (In Russ.)].
 11. Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Волох Ю.В. и др. Изучение протективной активности белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae* в гетерологичной системе. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2015;6:51–5. [Vorobyev D.S., Semenova I.B., Volokh Yu.V. et al. Study of protective activity of protein-containing antigens of *Streptococcus pneumoniae* in a heterologous system. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2015;6:51–5 (In Russ.)].
 12. Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Волох Ю.В. и др. Свойства нативных белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2019;1:22–8. [Vorobyev D.S., Semenova I.B., Volokh Yu.V. et al. Properties of native protein-containing antigens of *Streptococcus pneumoniae*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2019;1:22–8. (In Russ.)]. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-1-22-28.
 13. 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):21–7. [Kukina O.M., Gruber I.M., Akhmatova N.K. et al. Study of the immunobiological properties of surface protein-containing antigens of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. Epidemiologiya i vaksino-profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention 2020;19(3):21–27. (In Russ.)]. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-3-21-27.
 14. Ванеева Н.П., Ястребова Н.Е. Специфический иммунный ответ к отдельным капсульным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae* у здоровых доноров крови и лиц, иммунизированных пневмококковыми вакцинами. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2015;5:20–6. [Vaneeva N.P., Yastrebova N.E. Specific immune response to certain capsule polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* in healthy blood donors and individuals immunized with pneumococcal vaccines. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2015;5:20–6. (In Russ.)].
 15. Hoover J.L., Lewandowski T.F., Mininger C.L. et al. A robust pneumonia model in immunocompetent rodents to evaluate antibacterial efficacy against *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* or *A. baumannii*. J Visualized Experiments 2017;119:e55068. DOI: 10.3791/55068.
 16. Гланц С.А. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. С. 386–394. [Glantz S.A. Biomedical statistics. Moscow: Praktika, 1998. Pp. 386–394. (In Russ.)].
 17. Петухова Е.С., Воробьев Д.С., Сидоров А.В. и др. Иммунизация рекомбинантным пневмолизином вызывает выработку антител и защищает мышей в модели системной инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2019;168(10):471–3. [Petukhova E.S., Vorobyev D.S., Sidorov A.V. et al. Immunization with recombinant pneumolysin induces the production of antibodies and protects mice in a model of systemic infection caused by *Streptococcus pneumoniae*. Bulletin experimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2019;168(10):471–3. (In Russ.)].
 18. Ястребова Н.Е., Токарская М.М., Барановская С.А. и др. Иммунобиологическая активность препарата Пневмовик против экспериментальной пневмококковой инфекции. Биофармацевтический журнал 2020;12(5):45–9. [Yastrebova N.E., Tokarskaya M.M., Baranovskaya S.A. et al. Immunobiological activity of the drug Pneumovic against experimental pneumococcal infection. Biofarmatsevticheskii Zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals 2020;12(5):45–9. (In Russ.)].

Вклад авторов

Д.С. Воробьев: иммунизация и заражение животных, получение индивидуальных сывороток мышей, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 М.М. Токарская, С.А. Барановская, О.М. Афанасьева: иммунизация и заражение животных, определение количества бактерий, высеваемых из легких мышей;
 Е.А. Стефутушкина, Е.А. Асташкина, О.В. Жигунова: определение количества бактерий, высеваемых из легких мышей;
 Ю.В. Волох: иммунизация и заражение животных;
 А.Ю. Леонова, Е.С. Петухова: обзор публикаций по теме статьи;
 И.Б. Семенова: обзор публикаций по теме статьи, редактирование статьи;
 Д.Н. Нечаев, Е.О. Кравцова: получение данных для анализа, статистический анализ;
 Н.Н. Овечко: постановка иммуноферментного анализа;
 Н.Е. Ястребова, И.М. Грубер, Н.А. Михайлова: анализ полученных данных, редактирование статьи.

Authors contribution

D.S. Vorobyev: immunization and infection of animals, obtaining individual sera of mice, analysis of the data obtained, writing the text of the manuscript;
M.M. Tokarskaya, S.A. Baranovskaya, O.M. Afanasyeva: immunization and infection of animals, determination of the number of bacteria inoculated from the lungs of mice;
E.A. Stefutushkina, E.A. Astashkina, O.V. Zhigunova: determination of the number of bacteria inoculated from the lungs of mice;
Yu.V. Volokh: immunization and infection of animals;
A.Yu. Leonova, E.S. Petukhova: review of publications on the topic of the article;
I.B. Semenova: review of publications on the topic of the article, editing of the article;
D.N. Nechaev, E.O. Kravtsova: obtaining data for analysis, statistical analysis;
N.N. Ovechko: setting of enzyme immunoassay;
N.E. Yastrebova, I.M. Gruber, N.A. Mikhailova: analysis of the data obtained, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.С. Воробьев / D.S. Vorobyev: <https://orcid.org/0000-0002-1926-8803>
М.М. Токарская / M.M. Tokarskaya: <https://orcid.org/0000-0002-5175-5433>
С.А. Барановская / S.A. Baranovskaya: <https://orcid.org/0000-0003-1769-3811>
Е.А. Стефутушкина / E.A. Stefutushkina: <https://orcid.org/0000-0002-3209-617X>
О.М. Афанасьева / O.M. Afanasyeva: <https://orcid.org/0000-0003-0875-4141>
Е.А. Асташкина / E.A. Astashkina: <https://orcid.org/0000-0001-6234-0156>
О.В. Жигунова / O.V. Zhigunova: <https://orcid.org/0000-0002-3958-6219>
Ю.В. Волох / Yu.V. Volokh: <https://orcid.org/0000-0002-5161-4964>
А.Ю. Леонова / A.Yu. Leonova: <https://orcid.org/0000-0002-2889-2405>
Е.С. Петухова / E.S. Petukhova: <https://orcid.org/0000-0003-0796-5764>
И.Б. Семенова / I.B. Semenova: <https://orcid.org/0000-0002-6630-4838>
Д.Н. Нечаев / D.N. Nechaev: <https://orcid.org/0000-0002-7592-3809>
Е.О. Кравцова / E.O. Kravtsova: <https://orcid.org/0000-0002-9100-0422>
Н.Н. Овечко / N.N. Ovechko: <https://orcid.org/0000-0001-8550-1290>
Н.Е. Ястребова / N.E. Yastrebova: <https://orcid.org/0000-0002-6911-1345>
И.М. Грубер / I.M. Gruber: <https://orcid.org/0000-0002-1922-4640>
Н.А. Михайлова / N.A. Mikhailova: <https://orcid.org/0000-0002-8532-4690>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Statement of the welfare of animals. The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes.

Статья поступила: 06.10.2021. Принята к публикации: 29.10.2021.

Article submitted: 06.10.2021. Accepted for publication: 29.10.2021.