

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАКЦИНЫ И ПРОБИОТИКИ КАК ВОЗМОЖНЫЕ СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ ОТ СТРЕПТОКОККОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

СУВОРОВ А. Н., ЛЕОНТЬЕВА Л. Ф., ЕРМОЛЕНКО Е. И., ГРАБОВСКАЯ К. Б., МЕРИНГОВА Л. Ф., КОРОЛЕВА И. В., ДУПЛИК Н. В., ГУПАЛОВА Т. В., КОРЖУЕВА А. С., ЕЛИСЕЕВ Ф. В., БОЧКАРЕВА А. Н., академик РАМН ТОТОЛЯН А. А. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН», Санкт-Петербург

Суворов А. Н., Леонтьева Л. Ф., Ермоленко Е. И., Грабовская К. Б., Мерингова Л. Ф., Королева И. В., Дуплик Н. В., Гупалова Т. В., Коржуева А. С., Елисеев Ф. В., Бочкарева А. Н., Тотолян А. А. Рекомбинантные вакцины и пробиотики как возможные средства защиты от стрептококковых заболеваний // Мед. акад. журн. 2010. Т. 10. № 2. С. 32–39. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12.

Стрептококковые заболевания занимают существенное место в структуре общей инфекционной патологии. В поиске новых приемов профилактики и лечения стрептококкозов был разработан подход, основанный на использовании рекомбинантной вакцины, состоящей из смеси иммуногенных полипептидов, соответствующих поверхностным белкам стрептококков группы В. Исследования показали, что вакцина, представленная смесью трех полипептидов: Vac, ScaAB, ScpB, характеризуется выраженной иммуногенностью и протективностью. Показана перспективность включения в вакцину четвертого компонента – адгезина SspB1. Комбинированные вакцинные препараты обеспечивают защиту против стрептококков групп А, В, а также пневмококков. Параллельно разрабатывается подход, основанный на использовании молочнокислых бактерий-пробиотиков, обладающих выраженным антагонизмом к патогенным стрептококкам. Обнаружены штаммы пробиотиков, способных элиминировать патогенные бактерии из организма лабораторных животных.

Suvorov A. N., Leontjeva L. F., Ermolenko E. I., Grabovskaya K. B., Meringova L. F., Koroleva, I.V., Duplik N. V., Gupalova T. V., Korzhueva A. S., Eliseev F. V., Bochkareva A. N., Totolyan A. A. Recombinant vaccines and probiotics as possible means of protection from streptococcal infections // Med. Acad. Journ. 2010. Vol. 10. № 2. P. 32–39. Institute for Experimental Medicine Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 197376.

Streptococcal diseases are important human pathogens requiring search for new approaches for treatment and prophylactics. Recombinant streptococcal vaccine based on the mixture of the immunogenic surface expressed proteins had been developed. It was shown that the vaccine as mixture of three peptides Vac, ScaAB and ScpB is immunogenic and provides protection against streptococci. Recently it was suggested to add the forth component – adherence protein SspB1. In this case vaccine protects not only against group B streptococcus but group A streptococcus and pneumococci. In parallel the approach based on usage of lactic acid bacteria – probiotics antagonistic to streptococci was evaluated. The probiotic strains able to eliminate pathogenic bacteria from the organism of laboratory animals were selected.

Для корреспонденции: Тотолян Артем Акопович, тел. раб. 8 (812) 234-37-37, e-mail: iem@iem.spb.ru

ВВЕДЕНИЕ

В структуре инфекционной заболеваемости к числу наиболее распространенных и тяжелых относятся болезни, вызванные патогенными стрептококками. Связанный с этим экономический ущерб более чем в 10 раз превосходит ущерб, нанесенный всеми кишечными инфекциями, включая сальмонеллезы [6]. Представления о возможности контроля над стрептококковой заболеваемостью с помощью антибиотиков не оправдались, как вследствие особенностей самих возбудителей, так и по причине возросшего количества аллергических осложнений у лиц, получающих антибиотики. В связи с этим в мировой науке происходит интенсивный поиск но-

вых подходов к лечению и профилактике стрептококковых заболеваний. Вакцинация против стрептококков, как наиболее рациональное решение проблемы, столкнулась с целым рядом биологических и технологических проблем, которые в первую очередь были обусловлены перекрестными реакциями между поверхностными антигенами стрептококков и антигенами тканей человека. Поэтому при создании вакцин против стрептококков авторы были вынуждены осуществлять поиск специфических антигенов белковой или полисахаридной природы, не приводящих к иммунопатологическим осложнениям. Другим возможным подходом к лечению и профилактике стрептококковых инфекций является использование бактериальных штаммов-пробиотиков, обладающих

выраженным антагонизмом к патогенным стрептококкам. При этом обязательной особенностью пробиотиков является умеренный антагонизм в отношении собственной микрофлоры.

Исследования этого плана в Отделе молекулярной микробиологии НИИЭМ СЗО РАМН развиваются по обоим направлениям: как по линии создания рекомбинантной полипептидной вакцины, так и в направлении селекции эффективных штаммов-пробиотиков. Анализ особенностей иммунного ответа на введение бактериальных антигенов, представленных поверхностными белками стрептококков, позволил отобрать ряд белков (белок-рецептор иммуноглобулина А – Вас, липопротеин ScaAB, C5a пептидаза ScpB и адгезин-SspB1), способствующих формированию протективного иммунитета против инфекций, вызванных стрептококками группы В. Настоящая публикация посвящена оценке состояния исследований вакцинных препаратов и перспектив создания стрептококковой вакцины, а также анализу штаммов молочнокислых бактерий-пробиотиков, пригодных в борьбе со стрептококковой патологией.

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы, культуральные среды и условия роста. В работе были использованы референс штаммы *Streptococcus agalactiae* – 090R (Ia), 5/70 (Iac), 60/59 (II), 55/81 (III), 72/93 (III), 2/68 (VI); референс штамм *Streptococcus pyogenes* – SF370 (M1); штамм *Escherichia coli* M15 из микробиологической коллекции Национального центра ВОЗ по изучению стрептококков (Санкт-Петербург, Россия). СГВ культивировали на среде THB (Difco, США) при 37 °С в течение 12 ч. Клетки *E. coli* выращивали на среде ВНИ (Gibco, США) с добавлением канамицина до конечной концентрации 25 мкг/мл при 37 °С и интенсивном перемешивании в течение 12 ч. Для получения рекомбинантного полипептида трансформанты *E. coli* выращивали на среде ВНИ с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и канамицина (25 мкг/мл) при 37 °С и интенсивном перемешивании.

Генетические методы. Амплификацию генетических фрагментов на матрице хромосомной ДНК штамма 090R осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и специально сконструированных праймеров. ПЦР проводили в амплификаторе с активным регулированием («Терцик», Россия). После разделения в 1,0% агарозном геле ампликоны выделяли из агарозы с помощью набора «QIAquick Gel Extraction Kit» (Qiagen, США). Клонирование осуществляли в плазмидный вектор pQE-30 («The QIAexpress System», Qiagen, США). Трансформацию проводили в *E. coli* M15.

Методы белковой химии. Выделение рекомбинантных полипептидов из культур штаммов-проду-

центов *E. coli* проводили путем вскрытия клеточных осадков в ультразвуковом дезинтеграторе с последующей очисткой рекомбинантного полипептида методом аффинной хроматографии на колонке с Ницефарозой (Amersham, США).

SDS-электрофорез белков проводили в 12% полиакриламидном геле (PAGE) в вертикальном пластинчатом аппарате Mini-PROTEAN II (BioRad, США). Молекулярную массу (М.М.) рекомбинантных полипептидов оценивали в SDS-PAGE. Количественное определение белка в растворах проводили по методу Лоури [3].

Иммунологические методы. Иммунный ответ к рекомбинантным полипептидам изучали на беспородных мышах-самцах массой 20 г, полученных из питомника «Рапполово», РАМН. Иммунизацию проводили двукратно подкожно, используя гидроокись алюминия в качестве адъюванта (Pierce, США). Мышам вводили по 0,2 мл рекомбинантного полипептида в смеси с адъювантом в объемном соотношении 1:1. При первой инъекции концентрация полипептидов составляла 100 мкг/мл, при второй – 50 мкг/мл; инъекции проводили на 1- и 22-й дни соответственно.

Наличие сывороточных IgG, специфичных в отношении к рекомбинантным полипептидам, определяли, используя пул сывороток от 4 животных, методом иммуноферментного анализа, как описано [4].

Опсонизирующую активность антител по отношению к стрептококкам групп А, В и пневмококкам изучали на суточном монослое мышинных перитонеальных макрофагов, как описано [1]. Исследование протективных свойств циркулирующих специфических антител в условиях *in vivo* проводили на модели генерализованной СГВ-инфекции у мышей. Мышей предварительно иммунизировали по указанной выше схеме. Контрольным мышам в том же режиме подкожно вводили адъювант. Общим группам мышей внутрибрюшинно или интраназально вводили различные варианты СГВ или СГА. Оценку протективности мышинных специфических антител к рекомбинантным полипептидам проводили путем определения количества стрептококков в селезенке или в легких на разных сроках развития инфекции, высевая на чашки с кровяным агаром серию десятикратных разведений каждого гомогената селезенки, как описано [1].

Опыты по пассивной защите проводили на интактных мышах. Испытуемую специфическую антисыворотку в течение 2 ч при +4 °С инкубировали совместно со стрептококками, а затем суспензию стрептококков разводили до сублетальной дозы и вводили внутрибрюшинно мышам. Оценку протективной эффективности мышинных специфических антисывороток проводили путем определения коли-

чества стрептококков в селезенке на разных сроках развития инфекции, высеивая на чашки с кровяным агаром серию десятикратных разведений каждого гомогената селезенки. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Исследование антимикробной активности живых культур LAB. Исследование антимикробного действия живых бактерий родов *Lactobacillus* и *Enterococcus* проводили методами штриховых посевов и предложенным нами вариантом метода двухслойного агара. Исследование антимикробного действия пробиотиков на модели вагинита у крыс проводилось согласно [3].

Компьютерный анализ. Нуклеотидная последовательность генов поверхностных белков *scpB*, *bac*, *sspB1*, *scaAB* исследовалась с использованием компьютерных баз данных PubMed и GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Анализ аминокислотной последовательности проводили с помощью программы ExPasy. Конструирование олигонуклеотидных праймеров осуществляли с помощью компьютерных программ Primer 3 и OLIGO 4.0. Средние значения результатов экспериментов обрабатывали с помощью программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ иммуногенности смеси рекомбинантных полипептидов. Проведенные ранее исследования позволили установить, что рекомбинантные фрагменты нескольких поверхностных белков СГВ, введенные в форме монопрепаратов, обладают способностью стимулировать у лабораторных животных иммунный ответ, направленный против различных штаммов стрептококков группы В [1, 2, 10]. В целях расширения специфичности защитного эффекта нами был исследован комплексный вакцинный препарат, составленный из трех рекомбинантных полипептидов – P6, ScaAB и ScpB1, взятых в эквимолярном соотношении.

Результаты иммунизации оценивались по ряду критериев, включая динамику нарастания титров специфических иммуноглобулинов (рис. 1).

Было установлено, что при использовании одинаковой схемы иммунизации иммуногенность каждого полипептида в составе комплексного вакцинного препарата была выше, чем при их индивидуальном введении. Объединение полипептидов в едином вакцинном препарате не изменило относительного соотношения иммуногенности компонентов. Как при индивидуальном, так и при комплексном введении наименьшей иммуногенностью обладал рекомбинантный фрагмент С5а пептидазы – ScpB1. Последнее обстоятельство обусловило поиск путей увеличения иммуногенности данного пептидно-

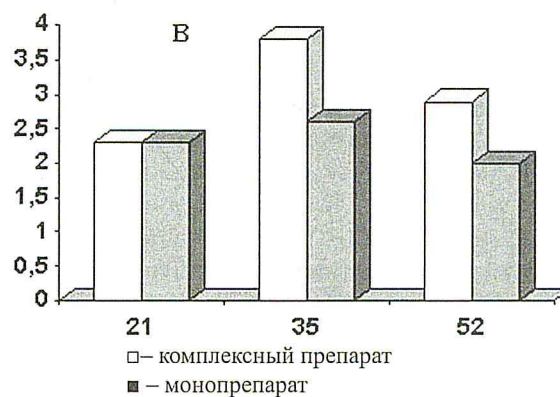
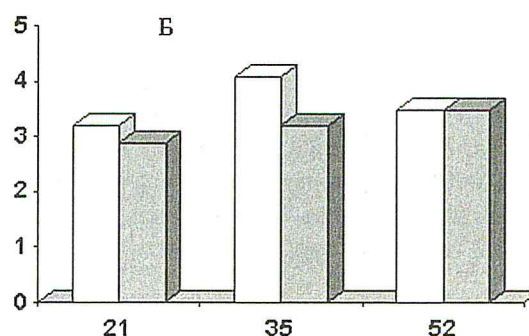
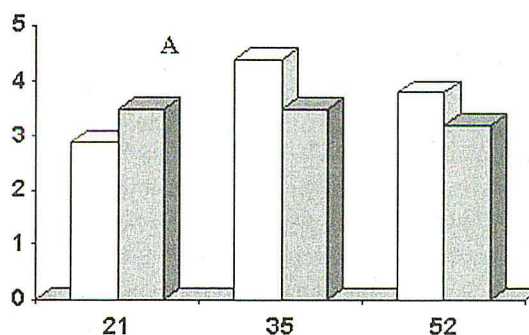


Рис. 1. Динамика иммунного ответа на введение рекомбинантных полипептидов в форме моно- и комплексного препарата: А – полипептид ScaAB, Б – полипептид P6, В – полипептид ScpB1.

По оси абсцисс – время после начала инфекции в днях, по оси ординат – lg 1/титр

го компонента за счет оптимизации его вторичной структуры (см. ниже).

Анализ протективной эффективности специфического иммунного ответа в отношении стрептококков группы В и других видов патогенных стрептококков. Протективную эффективность трехкомпонентной вакцины на основе рекомбинантных полипептидов СГВ оценивали при эксперимен-

тальной инфекции, вызванной внутрибрюшинным заражением интактных и иммунных мышей стрептококками группы В (штамм Н36 II серотипа) и стрептококками группы А (SF370-M1).

Заражение проводили на 42-й день от начала иммунизации мышей трехкомпонентной вакциной. Установлено, что в обоих случаях процесс очищения селезенок у иммунных мышей происходит ускоренными темпами по сравнению с интактными мышами, что свидетельствует об эффективности препарата в отношении инфекции, вызванной не только СГВ, но и СГА (рис. 2).

Анализ иммуногенности рекомбинантных поверхностных полипептидов СГВ, помимо трех, обозначенных выше, позволил дополнить вакцину четвертым компонентом – полипептидом SspB1, соответствующим поверхностно локализованному стрептококковому адгезину. Данный белок, относящийся по структурным характеристикам к белкам секреторных систем пятого типа, присутствует на поверхности порядка 50% штаммов СГВ, циркулирующих в России. При этом штаммы, содержащие данный белок на поверхности, характеризуются наиболее высокой вирулентностью [5]. Монопрепарат SspB1 обладает выраженной иммуногенностью и протективной эффективностью в отношении СГВ (в печати).

По данным литературы, гены, кодирующие SspB-подобные адгезины, а также ScaAB-подобные липопротеины, представлены в геномах патогенных стрептококков различных видов. Это дало основание предположить, что специфичность вакцинных препаратов, содержащих эти белки, может выходить за пределы стрептококков группы А и В.

Для оценки способности ScaAB- и SspB1-специфических антител опсонизировать представителей *S. pneumoniae*, обеспечивая таким образом их дальнейшую ускоренную элиминацию, был использован опсонофагоцититарный тест. Для исследования были выбраны три клинических изолята пневмококков, обозначенные как штаммы 1, 2 и 89 (рис. 3). Антитела, специфичные в отношении SspB1, опсонизовали все исследованные пневмококковые штаммы, но в разной степени. Только один из трех исследованных штаммов, штамм 2, оказался восприимчивым к ScaAB-специфическим антителам. Полученные результаты свидетельствуют о том, что специфичность иммунного ответа к рекомбинантным полипептидам, на основе поверхностных белков СГВ, не ограничивается пределами гомологичной группы стрептококков и такие вакцинные препараты могут быть эффективными, в том числе в отношении СГА и пневмококков.

Повышение иммуногенности рекомбинантных полипептидов за счет изменения их вторичной структуры. В целях повышения иммуногенности

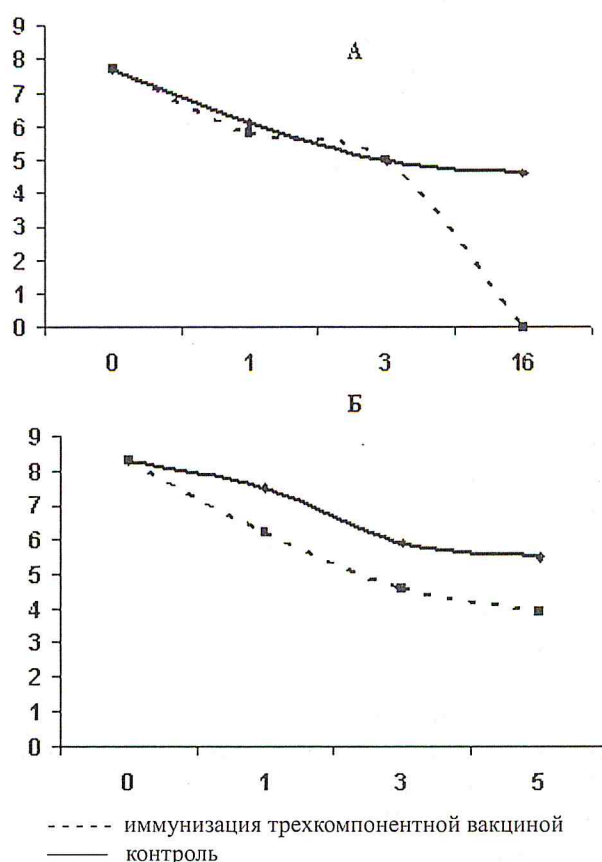


Рис. 2. Процесс элиминации возбудителя из организма иммунных и контрольных мышей: А – инфекция СГВ (H36), Б – инфекция СГА (M1). По оси абсцисс – время после заражения в часах, по оси ординат – Ig KOE

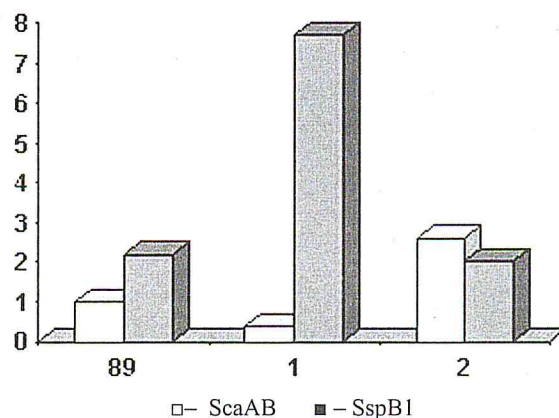


Рис. 3. Опсонизация *Str. pneumoniae* антителами, специфичными к SspB1 и ScaAB. По оси абсцисс – штаммы *Str. Pneumoniae*, по оси ординат – кратность прироста ФИ

вакцинных компонентов, представленных в составе полипептидной вакцины, было проведено изучение целесообразности выбора пептидных вариантов на основании их вторичной структуры. С помощью компьютерной программы ExPASy была проанали-

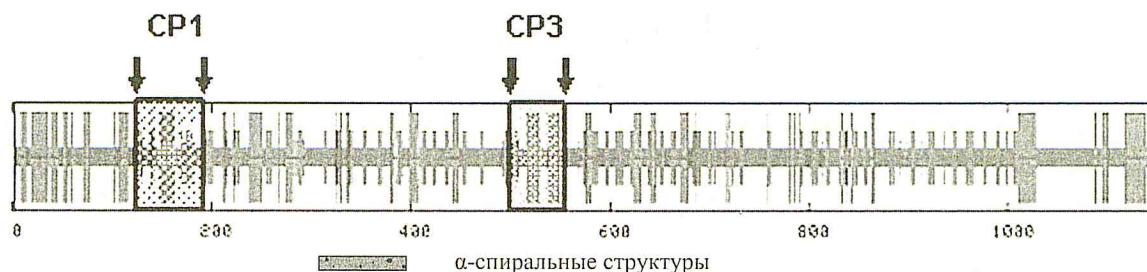


Рис. 4. Анализ α -спиральных структур в молекуле C5a-пептидазы СГВ

зирована аминокислотная последовательность C5a-пептидазы СГВ (A909) из банка данных «GeneBank» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для дальнейших исследований были выбраны два участка C5a-пептидазы (CP1 и CP3), в которых содержание α -спиральных структур составляло 28% и 41% соответственно (рис. 4). Участки гена C5a-пептидазы *scpB*, кодирующие CP1 и CP3, были проклонированы в гетерологичной системе *E. coli* с использованием экспрессионных векторов pQE. В результате были получены штаммы-продуценты рекомбинантных полипептидов CP1 и CP3. Молекулярная масса пептидов оказалась равной 12 кДа и 10 кДа для CP1 и CP3 соответственно. Оба полипептида индуцировали продукцию специфических антител, при этом иммунный ответ к полипептиду CP3 был выше на протяжении всего периода наблюдения (рис. 5). Мышинные антисыворотки с высоким уровнем содержания специфических антител были также проанализированы в условиях *in vitro* (опсонофагоцитарный тест) и *in vivo* (генерализованная стрептококковая инфекция), причем в обоих случаях была продемонстрирована их протективная эффективность (данные не приводятся).

Исследование антагонистической активности бактерий. Изучение антимикробной активности

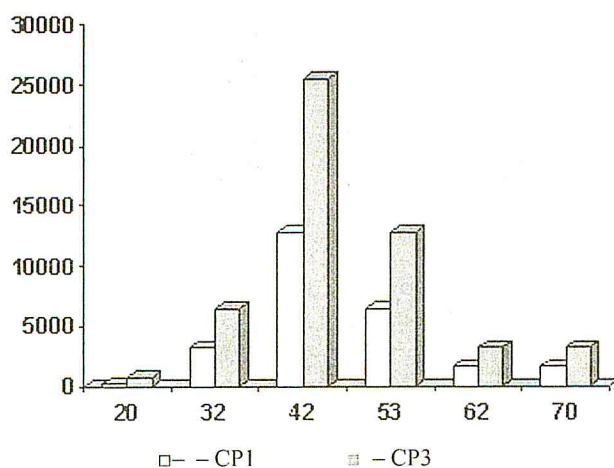


Рис. 5. Динамика иммунного ответа на введение рекомбинантных полипептидов CP1 и CP3.

По оси абсцисс – время в днях, по оси ординат – 1/титр

культур методом двухслойного агара было проведено с использованием набора штаммов молочнокислых бактерий-пробиотиков, которые проявили высокую антагонистическую активность. Для сравнительного исследования антимикробной активности был предложен количественный показатель – минимальная ингибирующая концентрация антагониста (МИКА). Установлено, что молочнокислые бактерии проявляли максимальный антистрептококковый эффект по отношению к стрептококкам группы А, промежуточное положение по чувствительности занимали СГС и СГВ (данные не приводятся). На рис. 6 представлена характеристика антагонистической активности штаммов различных молочнокислых бактерий по отношению к патогенным стрептококкам групп А и В (МИКА). Наиболее выраженным антагонизмом в данном исследовании характеризовался штамм *Enterococcus faecium* L3.

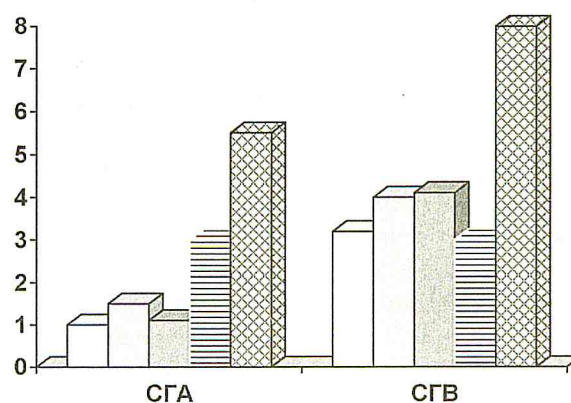


Рис. 6. Оценка степени антагонизма молочнокислых бактерий к патогенным стрептококкам групп А и В методом двухслойного агара *in vitro*.

По оси абсцисс – lg КОЕ/мл культур молочнокислых бактерий, по оси ординат – стрептококки групп А и В

- *Enterococcus faecium* L3
- *Lactobacillus fermentum* Z
- консорциум двух культур *Enterococcus faecium* L3 и *Lactobacillus fermentum* Z
- *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06
- *Lactobacillus fermentum* TS3-06

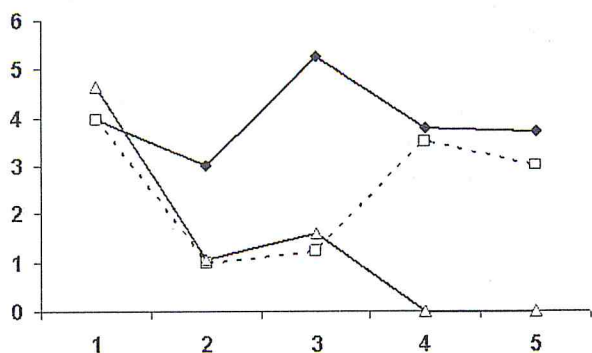


Рис. 7. Изменение показателей инфицированности патогенными бактериями влагалища крыс с экспериментальным вагинитом на фоне введения *E. faecium* L5 и молока.

По оси абсцисс – время в днях, по оси ординат – Ig KOE /мл

Воздействие различных молочнокислых бактерий на микрофлору влагалища на фоне экспериментальной бактериальной инфекции. В целях исследования характера действия пробиотических культур молочнокислых бактерий исследована способность одного из пробиотиков, *Enterococcus faecium* L3 с введенным в хромосому геном устойчивости к эритромицину, воздействовать на развитие инфекционного процесса, вызванного стрептококками. На рис. 7 продемонстрирована способность ингибировать рост стрептококков группы В, а также препятствовать колонизации этими микроорганизмами урогенитального тракта крыс. При введении пробиотика в виде молочнокислой закваски происходила элиминация патогенных бактерий из влагалища крыс не позднее 4- и 5-го дня наблюдений, в отличие от животных из контрольных групп, которые получали молоко или физиологический раствор (PBS).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проблема стрептококковой заболеваемости в мире не утратила своей остроты, несмотря на длительный опыт применения антибиотиков в клинической практике. В настоящее время в современной науке происходит откровенное соревнование различных исследовательских групп за право вывести на фармацевтический рынок новые препараты (в первую очередь вакцины), позволяющие защитить основные группы риска от стрептококковых инфекций. Группой риска при СГВ-инфекции являются беременные женщины (либо женщины, планирующие рождение ребенка); дети раннего школьного возраста являются основными мишенями для атаки СГА. Создание стрептококковых вакцин на основе инактивированных бактерий оказалось невозможным из-за перекрестных реакций, приводящих к иммунопатоло-

гическим процессам. Это обстоятельство заставило исследователей начать разработку вакцин на основе протективных антигенов. Первоначально в качестве вакцины против СГВ планировалось использовать препараты на основе полисахаридной капсулы стрептококков. Однако применение капсульных вакцин ограничивали антигенная вариабельность полисахаридов и их недостаточная иммуногенность. Для повышения иммуногенности полисахариды наиболее часто конъюгировали с токсинами, что отражалось на безопасности применения подобных препаратов [11]. Более успешным оказалось использование в качестве носителей поверхностных белков СГВ, таких, как альфа- [13] и/или бета-С протеин [14]. Вакцинирование животных препаратами индивидуальных стрептококковых белков показало, что белки могут обеспечить защиту от инфекции и без полисахаридного компонента [2]. В частности, существуют разработки, доказывающие протективность антител к поверхностному белку Sip, а также стрептококковым белкам фимбрий или пилей [9]. В настоящей работе приведены результаты исследований по созданию вакцины на основе четырех поверхностных белков СГВ. Идея использования относительно широкого спектра протективных полипептидов основывается на необходимости, с одной стороны, контролировать потенциально негативные свойства поверхностных стрептококковых структур, а с другой стороны, за счет применения белков, несущих консервативные для многих патогенных стрептококков участки, максимально расширить круг бактериальных штаммов, к которым осуществляется защита. Исследование иммуногенности пептидов, представляющих собой фрагменты полипептидов Vac, ScaAB, ScpB1, а также адгезина SspB1, показало, что данные пептиды обладают высокой иммуногенностью [10]. Данные рекомбинантные полипептиды, будучи введенными лабораторным животным как в форме монопрепаратов, так и в виде смесей, хорошо стимулируют выработку антител, способных опсонизировать СГВ, обеспечивая таким образом защиту от инфекционного начала. При этом протективный эффект наблюдался как в случае инфицирования предварительно иммунизированных животных, так и в условиях пассивно создаваемого иммунитета, когда антитела вводились животным непосредственно до введения стрептококков. Подобранные составы смесей рекомбинантных полипептидов обеспечивали протективность вакцинного препарата по отношению к широкому кругу штаммов СГВ и не обладали токсичностью для животных. В данном исследовании было показано, что использование комплекса полипептидов не отражалось отрицательно на свойствах иммуногенности каждого отдельного компонента. Другой важной особенностью данного комплекса

оказалось, то что за счет наличия в его составе антигенов, содержащих консервативные участки, появилась возможность обеспечить защиту от инфекции, вызванной не только стрептококками группы В, но и стрептококками группы А (*S. pyogenes*) и пневмококками (*S. pneumoniae*). Любопытно, что, помимо липопротеина ScaAB, защиту от пневмококков обеспечивали антитела против адгезина SspB1 (рис 2). Гомологи ScaAB имеются практически у всех грамположительных микробов, в частности высокоиммуногенный белок PsaA пневмококков близок ему по аминокислотному составу. Поэтому появление перекрестной защиты от пневмококков антителами против этого белка было ожидаемым. Белок SspB1 по структурным характеристикам принадлежит к семейству секреторных систем V типа [12]. Гомологи данного белка входят в состав фимбрий и адгезинов практически всех грамположительных патогенов, однако ген *SspB1* не имеет непосредственных гомологов в геномах других патогенов, за исключением *S. suis*. Можно предположить, что факт защиты от пневмококков в опсонофагоцитарном тесте был обусловлен наличием у последних структурных аналогов, которые перекрестно распознаются иммуноглобулинами, специфичными к SspB1.

Полученные данные указывают на перспективность четырехкомпонентной пептидной вакцины для защиты от широкого спектра бактериальных патогенов. При этом возможность вакцинальной защиты от таких опасных возбудителей заболеваний, как стрептококки группы А и пневмококки, открывает перспективы к широкому применению полипептидных вакцин как средства защиты от инфекций, вызванных грамположительными бактериями.

Критичным при этом остается поддержание достаточного уровня специфических протективных иммуноглобулинов. Для повышения иммуногенности полипептида, соответствующего С5а пептидазе, было осуществлено исследование по подбору компонентов в соответствии с их вторичной структурой. В частности, ранее было показано, что участки белков с повышенным содержанием альфа-структур обладают большей иммуногенностью [7]. Создание новых пептидов CP1 и CP3 с повышенной альфа-спирализацией и проверка их иммуногенности подтвердили данное предположение. Оказалось, что наибольшей иммуногенностью обладал максимально спирализованный пептид CP3. Кроме того, снижение титра специфических антител к CP3 проходило медленнее по сравнению с CP1. Полученные данные указывают на целесообразность модификации пептидных компонентов вакцины по принципу их структурной организации. Другим перспективным направлением исследований может явиться создание химерных

пептидов, содержащих антигенные детерминанты нескольких поверхностных белков стрептококков в одной молекуле.

Важным направлением борьбы с инфекционной заболеваемостью, помимо вакцинной профилактики, является поиск новых способов купирования уже развившейся инфекции. Интересной альтернативой применения классических антимикробных препаратов является использование бактериальных препаратов-пробиотиков, являющихся антагонистами патогенным бактериям. В настоящем исследовании было показано, что микроорганизмы, относящиеся к пробиотикам, существенно различаются по выраженности их антагонистической активности. При этом для каждого патогена можно подобрать своего наиболее активного антагониста. Возможность купирования инфекционного процесса, вызванного стрептококками, была продемонстрирована на модели инфекционного вагинита у крыс (рис. 7). Ценность разработки пробиотических подходов к терапии инфекций обусловлена растущим количеством патогенных штаммов, несущих гены лекарственной устойчивости, а также отсутствием повреждающего воздействия пробиотиков на слизистую хозяина.

В целом проведенные исследования открывают перспективы для практического внедрения новых подходов к профилактике и лечению стрептококковых заболеваний.

Литература

1. Грабовская К.Б., Леонтьева Г.Ф., Мерингова Л.Ф. и соавт. Протективные свойства некоторых поверхностных рекомбинантных полипептидов стрептококков группы В // ЖМЭИ. 2007. № 5. С. 44–51.
2. Дитина М.А., Мерингова Л.Ф., Леонтьева Г.Ф. и соавт. Сравнительное изучение конъюгированной и комбинированной экспериментальных вакцин против стрептококков группы В // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009. № 1. С. 37–41.
3. Марцинковская И.В., Ермоленко Е.И., Гончаров С.Б. и соавт. Изучение антимикробного действия пробиотических энтерококков *in vivo* // Рос. ветерин. журн. 2006. № 3. С. 15–18.
4. Мерингова Л.Ф., Войцеховский Б.Л., Духин А.И. и соавт. Применение методов химической кинетики для оценки аффинитета циркулирующих свободных и связанных с антигеном антител (модель экспериментальный грипп) // Иммунология. 1986. № 6. С. 48–51.
5. Суворов А.Н., Савичева А.М., Глушанова А.В. и соавт. Анализ клинических штаммов стрептококков группы В на наличие генов потенциальных адгезинов, локализованных на островах патогенности // Журн. акуш. и жен. бол. 2005. LV. С. 50–56.

6. Филатов Н.Н., Брико Н.И., Шаханина И.Л. Научно-организационные и методические основы эпидемиологического надзора за стрептококковой инфекцией группы А в условиях крупного города // 1998. № 1. С. 40–43.
7. Cantini F., Veggi D., Dragonetti S. et al. Solution structure of the factor H-binding protein, a survival factor and protective antigen of neisseria meningitidis // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. P. 9022–9026.
8. Lowry O.H., Rosenbraugh N.J., Ferr A.L., Randall R.J. Protein measurement-with the folin phenol reagent // J. Mol. Biol. 1957. Vol. 193. P. 265–273.
9. Maisey H.C., Quach D., Hensler M.E. et al. A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence // FASEB. 2008. Vol. 22 (6). P. 1715–1724.
10. Meringova L., Leontieva G., Grabovskaya K. et al. Immunogenicity and protection induced by recombinant group B streptococcal polypeptides Streptococci // New Insights Into an Old Enemy. 2006. P. 340–343.
11. Paoletti L.C., Peterson D.L., Legmann R., Collier R.J. Preclinical evaluation of group B streptococcal polysaccharide conjugate vaccines prepared with a modified diphtheria toxin and a recombinant duck hepatitis B core antigen // Vaccine. 2001. Vol. 20. P. 370–376.
12. Suvorov A.N., Ferretti J.J. Construction of a GBS-GAS DNA subtraction library allows discovery of previously unidentified GBS genes and rapid location of unique regions on the GBS chromosome // J. Basic Microbiol. 2004. Vol. 2. P. 64–74.
13. Yang H.H., Mascuch S.J., Madoff L.C., Paoletti L.C. Recombinant group B Streptococcus alpha-like protein 3 is an effective immunogen and carrier protein // Clin. Vaccine Immunol. 2008. Vol. 15. P. 1035–1041.
14. Yang H.H., Madoff L.C., Guttormsen H-K. et al. Recombinant Group B Streptococcus beta C protein and a variant with the deletion of its immunoglobulin A-binding site are protective mouse maternal vaccines and effective carriers in conjugate vaccines // Infection and Immunity. 2007. Vol. 75. P. 3455–3461.