

А.Н.Мокриевич, Г.М.Вахрамеева, Р.И.Миронова, Т.И.Комбарова, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева,
Т.Б.Кравченко, И.А.Дятлов, В.М.Павлов

СОЗДАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВАРИАНТОВ ВАКЦИННОГО ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* БЕЗ ГЕНОВ *IGLC*. СООБЩЕНИЕ 2

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk,
Российская Федерация

Делеция одной копии гена *iglC* в вакцинном штамме *F. tularensis* 15 не влияет на его способность размножаться в организме мышей, приводит к задержке выработки антител к суммарному антигену туляремии микроба, не изменяет уровень продукции гамма-интерферона в ответ на стимуляцию ультразвуковым дезинтегратором штамма *F. tularensis* 15, увеличивает LD₅₀ для мышей линии BALB/c на порядок при сохранении протективных свойств. Штамм 15 без двух копий гена *iglC* не способен размножаться в организме мышей, индуцирует выработку слабого гуморального ответа, отличается сниженной на порядок способностью формировать спленоциты, активирующиеся при добавлении туляремии антигена, полностью авирулентен и обладает сниженной протективной активностью. Введение мышам сывороток, взятых через 49 сут от животных, иммунизированных как исходным штаммом *F. tularensis* 15, так и его вариантами с одним и двумя инактивированными генами *iglC*, обеспечивало их стопроцентную защиту от последующего заражения 200 DCL штамма *F. tularensis* 15. Однако при заражении вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 и *F. tularensis* Schu (50 DCL и 25 DCL, соответственно) мышей линии BALB/c, которым за 24 ч были введены иммунные сыворотки, имело место только увеличение средней продолжительности жизни.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, ген *iglC*, протективность, антитела.

A.N.Mokrievich, G.M.Vakhrameeva, R.I.Mironova, T.I.Kombarova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva,
T.B.Kravchenko, I.A.Dyatlov, V.M.Pavlov

Construction and Investigation of the Variants of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* Lacking *iglC* Genes. Communication 2

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Single copy deletion of the *iglC* gene in the vaccine *Francisella tularensis* strain 15 has no impact on its ability to replicate in mice organism, factors into the delay of antibody production to total tularemia microbe antigen, does not affect gamma interferon production levels in response to stimulation by ultrasound disintegrator. It also increases LD₅₀ for BALB/c mice by an order while retaining protective properties. Strain *Francisella tularensis* 15 lacking two copies of the *iglC* gene cannot replicate in mice organism, induces weak humoral response, is fully avirulent, and has decreased protective activity. Treatment of mice with sera obtained from the animals immunized on day 49 post immunization both with the stock *F. tularensis* 15 strain and its variants with one or two inactivated *iglC* genes has provided for 100 % protection from challenge with 200 DCL of *F. tularensis* 15 strain. However in case of BALB/c mice exposure to virulent *F. tularensis* 503 and *F. tularensis* Schu strains (50 DCL and 25 DSL, respectively), treated with immune sera 24 hours before, registered has been only mean lifetime increase.

Key words: *Francisella tularensis*, *iglC* gene, protective activity, antibodies.

Ранее было показано, что инактивация двух копий гена *iglC* как в варианте экспериментального вакцинного штамма LVS (принадлежащему к голарктическому подвиду), так и в вирулентном штамме Schu неарктического подвида приводит к утрате их протективных свойств и, соответственно, неспособности защитить мышей от заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* [3, 4, 6]. Однако в этих работах не проведено детального изучения гуморального и клеточного звена противотуляремии иммунитета у мышей, вакцинированных дефектными по гену *iglC* штаммами.

Целью данной работы являлось изучение иммунобиологических свойств вариантов вакцинного штамма *F. tularensis* 15 без одной и двух копий гена *iglC*.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использова-

ли штаммы из Государственной коллекции «ГКПМ-Оболensk»: вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ; его нокаутные мутанты – *F. tularensis* 15/23-1 (с инактивированной одной копией гена *iglC*) и *F. tularensis* 15/23-2 (с инактивированными двумя копиями гена *iglC*); тест-заражающие вирулентные штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu.

Лабораторные животные. В работе использовались инбредные мыши линии BALB/c обоего пола (ФИБХ Питомник «Пушино», МО, г. Пушино). Вес мышей составлял 18–20 г, возраст – 6–8 недель. Содержание и манипуляции с животными выполняли в виварии, соответствующем требованиям GAC (Good Animal Care) и протоколу № P03-20 комитета по биоэтике ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.

Условия культивирования. Штаммы *F. tularensis* выращивали при температуре 37 °C на плотной (FTA) и жидкой (FTB) питательной среде. Состав

ФТА: 3,8 % эритрит-агар, 1 % высушенная кровь крупного рогатого скота, 1 % глюкоза, 0,05 % цистеин, 0,0025 % тиамин хлорид, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Московская обл.), Состав ФТВ [2]: 2 % ферментативный гидролизат казеина, 1 % дрожжевой экстракт, 1,2 % KH_2PO_4 , 1 % глюкоза, 0,001 % цистеин, 0,001 % FeCl_2 , pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Московская обл.). При необходимости в среду добавляли 100 мкг/мл полимиксина В.

Вирулентность. Мышам (по 5 в группе) вводили подкожно по 0,2 мл 10-кратных разведений бактериальной суспензии ($5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл) в забуференном физиологическом растворе, pH 7,4 (ЗФР), полученной из ночной агаровой культуры. За животными наблюдали в течение 28 дней. Погибших мышей вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Расчет величины LD_{50} проводили по методу Кербера в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1].

Приживаемость штаммов *F. tularensis* в организме мышей. Экспериментальных животных вакцинировали подкожно клетками исследуемых штаммов *F. tularensis* в дозе $1 \cdot 10^2$ КОЕ для штаммов 15 и 15/23-1 и в дозе $1 \cdot 10^6$ КОЕ для штамма 15/23-2. На 4, 7, 14-е и 21-е сутки проводили эвтаназию животных, селезенки гомогенизировали и суспендировали в 5 мл ЗФР. Из полученной взвеси готовили десятикратные разведения. Высевы проводили на плотную питательную среду и инкубировали при температуре 37 °С. Результаты учитывали через 72 ч.

Протективность. Оценку способности исследуемых штаммов защищать животных (ED_{50}) от подкожного заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* проводили по количеству бактерий, защищающих 50 % вакцинированных мышей от заражения дозами 1000 DCL (Dosis certa letalis).

Определение уровня синтеза гамма-интерферона спленоцитами иммунизированных мышей. Мышей на 28-е сутки после иммунизации эвтаназировали ингаляцией CO_2 . Стерильно вскрывали брюшную полость и забирали селезенку, гомогенизировали через капроновый фильтр в среде RPMI-1640 (Панэко, Россия). Суспензию спленоцитов дважды промывали в среде RPMI-1640, после каждой промывки клетки осаждали центрифугированием при 250 g в течение 10 мин. Отмытые клетки суспендировали до конечной концентрации $5 \cdot 10^6$ клеток/мл в питательной среде на основе RPMI-1640 с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка, 2 мМ глутамина, 5 мМ меркаптоэтанола, 20 мкМ Нерес. Для индукции синтеза гамма-интерферона в среду культивирования вносили ультразвуковой дезинтегратор (УЗД) суспензии клеток *F. tularensis* (концентрация суспензии – $1 \cdot 10^8$ м.к./мл). Митоген конканавалин А (Sigma) в концентрации 5 мкг/мл применяли в качестве положительного контроля. Спленоциты культивировали при температуре 37 °С, 5 % CO_2 и 100 % влажности в течение 72 ч. Затем из лунок отбирали супернатант и определяли в нем концентрацию гамма-интерферона иммуноферментным методом, используя наборы

фирмы eBioScience (Австрия), согласно инструкции производителя.

Получение мышинных сывороток, специфичных к возбудителю туляремии. Мышам вводили подкожно клетки штаммов *F. tularensis* 15, *F. tularensis* 15/23-1 и *F. tularensis* 15/23-2. В разные сроки наблюдения животных эвтаназировали и проводили тотальный забор крови (от каждой мыши – отдельно). На следующий день сыворотки объединяли по группам, прогревали при температуре 55 °С в течение 30 мин для инактивации комплемента и определяли титр противотуляремийных антител с использованием УЗД клеток штамма *F. tularensis* 15.

ИФА. На 96-луночные планшеты фирмы Greiner Bio-One (Германия) средней сорбции адсорбировали УЗД *F. tularensis* (концентрация суспензии – $1 \cdot 10^8$ м.к./мл) в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6. Адсорбцию антигенов проводили в течение ночи при температуре 4 °С. Для инактивации свободных центров связывания в лунки добавляли раствор 3 % сухого обезжиренного молока (Fluka, Швейцария) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 мин.

Сыворотки титровали с шагом 1:2 и инкубировали с антигеном в течение 1 ч при температуре 37 °С. После удаления сыворотки и трехкратной отмытки карбонат-бикарбонатным буфером в лунки вносили раствор конъюгата козьих антимышинных поливалентных антител к иммуноглобулинам мыши (IgG, IgA, IgM) – пероксидаза хрена (Amersham, США) в рабочем разведении 1:10000 и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С.

Ферментативную реакцию проводили с использованием в качестве хромогена *o*-фенилендиамина (ОФД) (4 мг/мл). Планшет инкубировали в течение 20 мин в темноте и реакцию останавливали внесением 0,1 мл 0,1 М соляной кислоты. Оптическую плотность (ОД) в лунках измеряли при длине волны 492 нм. За титр антител принимали максимальное разведение сыворотки, в которой ОД хромогена превышало двойное значение фоновой оптической плотности.

Оценка гуморальной пассивной защиты. Чистым мышам (по 8 животных в группе) внутрибрюшинно вводили по 200 мкл сыворотки и через 24 ч животных заражали подкожно бактериальными суспензиями штаммов *F. tularensis* 15, *F. tularensis* 503 и *F. tularensis* Schu. За животными наблюдали в течение 21 дня. В качестве контроля использовали мышей, которым внутрибрюшинно вводили сыворотку, полученную от чистых животных.

Результаты и обсуждение

Персистенцию бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* и его производных в организме экспериментальных мышей оценивали по концентрации туляремийного микроба в селезенках на 4, 7, 14-е и 21-е сутки после инфицирования (рис. 1).

Из данных рис. 1 следует, что наличие гена *iglC*

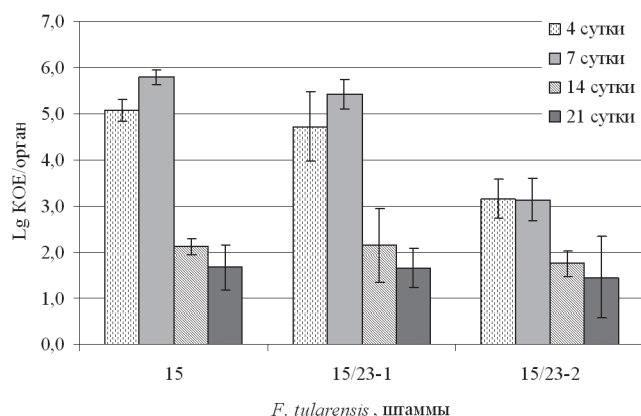


Рис. 1. Влияние гена *iglC* *F. tularensis* на способность к персистенции в организме мышей линии BALB/c. Результаты показаны как значение Lg КОЕ/орган с доверительным интервалом ($p < 0,05$)

позволяет штаммам *F. tularensis* 15 и 15/23-1, вводимым мышам в дозе $1 \cdot 10^2$ КОЕ/мышь, не только сохранять жизнеспособность, но и размножаться в организме мышей в течение первых 7 сут. Количество бактерий штаммов 15 и 15/23-1 в селезенках на 14-е сутки уменьшалась в 1000 раз.

Модифицированный штамм *F. tularensis* без двух генов *iglC* даже при введении мышам бактериальных клеток в количестве $1 \cdot 10^6$ КОЕ/мышь хотя и обнаруживался в организме животных вплоть до 21-х суток, но, видимо, не размножался.

У вакцинированных мышей была определена динамика нарастания концентрации антител к антигенам *F. tularensis*. Сыворотки были получены в период с 4-го по 28-й день после начала эксперимента и объединены по группам. Реципрокные титры антител в объединенных сыворотках различных групп мышей приведены на рис. 2, данные которого показывают, что иммунизация штаммом *F. tularensis* 15 (доза – $1 \cdot 10^2$ КОЕ) приводила к более раннему (на 7-е сутки) появлению наибольшего уровня антител к суммарному антигену туляремиального микроба в титре 1:1200 по сравнению со штаммом *F. tularensis*

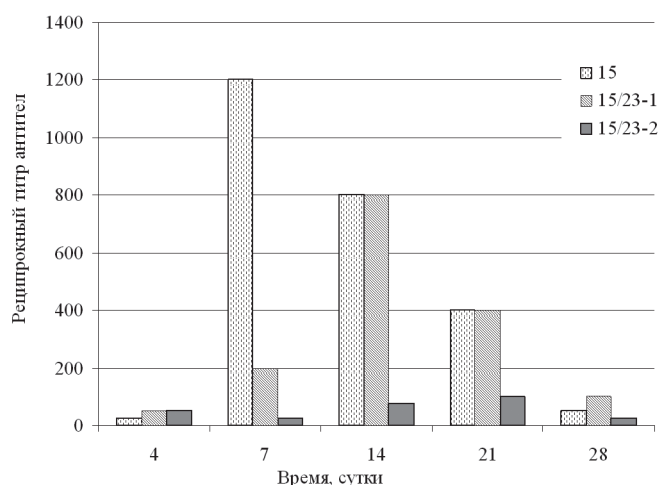


Рис. 2. Влияние гена *iglC* *F. tularensis* на динамику уровня индукции специфических иммуноглобулинов у вакцинированных мышей

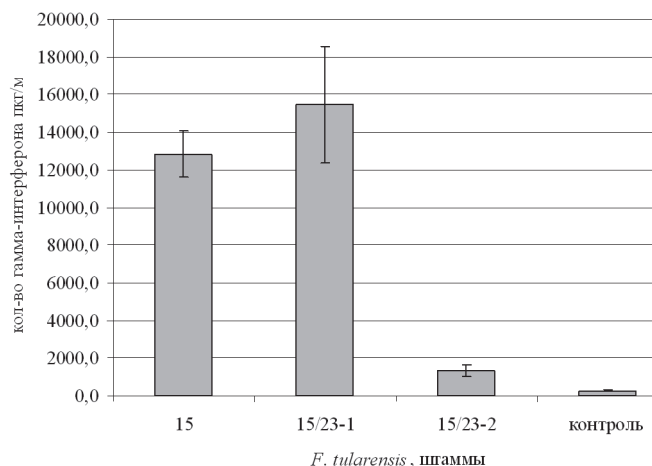


Рис. 3. Влияние гена *iglC* *F. tularensis* на индуцированный синтез гамма-интерферона спленоцитами мышей

15/23-1 (доза $1 \cdot 10^2$ КОЕ), введение которого приводило к индукции наибольших значений титров антител 1:800 на 14-е сутки. Штамм *F. tularensis* 15/23-2 (доза $1 \cdot 10^6$ КОЕ) индуцировал выработку слабого гуморального ответа – титры антител достигали наибольших значений 1:100 только на 21-е сутки.

Напряженность клеточного звена иммунитета у вакцинированных мышей оценивали по продукции гамма-интерферона спленоцитами в ответ на стимуляцию УЗД штамма *F. tularensis* 15 (рис. 3).

В группах мышей, вакцинированных штаммами *F. tularensis* 15 и 15/23-1 (дозы $1 \cdot 10^2$ КОЕ), продукция гамма-интерферона превышала более чем в 10 раз продукцию гамма-интерферона спленоцитами, взятыми у мышей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15/23-2 (доза $1 \cdot 10^6$ КОЕ). Это позволяет предполагать, что инактивация одной копии гена *iglC* не влияет на способность бактерий формировать спленоциты, активирующиеся при добавлении туляремиального антигена. В то же время отсутствие обеих копий гена *iglC* значительно снижает эту способность, что следует из низкого уровня синтеза гамма-интерферона. Величины LD_{50} и ED_{50} для мышей линии BALB/c исследуемых штаммов приведены в таблице.

Делеция одной копии гена в вакцинном штамме *F. tularensis* 15/23-1 при подкожном заражении мышей снижала вирулентность только в 10 раз, тогда как делеция обеих копий гена *iglC* делала штамм полностью авирулентным.

Вакцинный штамм без одной копии гена *iglC* защищал мышей от заражения вирулентными штаммами туляремиального микроба с эффективностью, характерной для родительского вакцинного штамма

Величины LD_{50} и ED_{50} на модели мышей линии BALB/c

Штаммы <i>F. tularensis</i>	LD_{50}	ED_{50} для штамма <i>F. tularensis</i> 503	ED_{50} для штамма <i>F. tularensis</i> Schu
15 НИИЭГ	79,0 (40÷110)	8,5 (1,8÷53,7)	34,5 (13,8÷102,7)
15/23-1	794,0 (251÷3162)	10,9 (2,8÷43,6)	45,9 (18,8÷124,6)
15/23-2	>10 ⁹	Нет защиты	Нет защиты

F. tularensis 15. Удаление обеих копий гена из вакцинного штамма приводило к исчезновению протективности, хотя наблюдалось удлинение средней продолжительности жизни (СПЖ) животных до 9,3 сут в случае заражения штаммом *F. tularensis* 503 и до 8,7 сут при заражении штаммом *F. tularensis* Schu по сравнению с контрольной группой (СПЖ – 5,6 и 5,2 сут соответственно).

Введение мышам сывороток, взятых через 49 сут от животных, иммунизированных как исходным штаммом *F. tularensis* 15 ($3,5 \cdot 10^1$ КОЕ/мышь), так и его вариантами с одним ($8 \cdot 10^1$ КОЕ/мышь) и двумя ($1,3 \cdot 10^6$ КОЕ/мышь) инактивированными генами *iglC*, обеспечивало их стопроцентную защиту от последующего заражения 200 DCL штамма *F. tularensis* 15. Однако в случае заражения мышей, которым предварительно были введены иммунные сыворотки, вирулентными штаммами – 50 DCL *F. tularensis* 503 и 25 DCL *F. tularensis* Schu – имело место только увеличение СПЖ. В случае введения сывороток от животных, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15/23-2, эта величина составляла 8 и 7,14 сут соответственно, тогда как для животных, обработанных нормальной сывороткой СПЖ, равнялась 6,75 и 6,3 сут, а чистых животных – 6,0 и 5,8 сут соответственно.

Результаты проведенных нами экспериментов по оценке протективности вариантов вакцинного штамма *F. tularensis* 15 без одной и двух копий генов *iglC* согласуются с высказанным ранее мнением о том, что для формирования протективного иммунитета необходимо размножение туляремии микроба в клетках иммунной системы [5]. Нами показано, что штамм *F. tularensis* 15 без двух копий генов *iglC* практически не способен к размножению в макрофагах, а также не способен индуцировать клеточный иммунитет и, как следствие, защищать животных от заражения вирулентными штаммами туляремии микроба. Введение высоких концентраций ($1 \cdot 10^7$ КОЕ) бактерий штамма *F. tularensis* 15/23-2 мышам индуцировало формирование протективных специфических антител, которые позволяли животным выживать после заражения вакцинным штаммом, но не защищали их от природных изолятов туляремии микроба. Полученные результаты дополнительно подтверждают положение о ключевой роли клеточного иммунитета в защите от туляремии инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 58 с.
2. Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 4(102):66–7.
3. Conlan J.W., Shen H., Golovliov I., Zingmark C., Oyston P.C.F., Wangxue C., House R.V., Sjöstedt A. Differential ability of novel attenuated targeted deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* strain SCHU S4 to protect mice against aerosol challenge with virulent bacteria: Effects of host background and route of immunization. *Vaccine*. 2010; 28:1824–31.
4. Golovliov I., Sjöstedt A., Mokrievich A., Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003; 222:273–80.
5. Pechous R.D., McCarthy T.R., Zahrt T.C. Working toward the Future: Insights into *Francisella tularensis* Pathogenesis and Vaccine Development. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 2009; 73(4):684–711.
6. Twine S.M., Bystrom M., Chen W., Forsman M., Golovliov I.R., Johansson A., Kelly J., Lindgren H., Svensson K., Zingmark C., Conlan W., Sjöstedt A. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58 kDa protein is attenuated for virulence and an effective live vaccine. *Infect. Immun.* 2005; 73(12):8345–52.

References

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz; 1962. 58 p.
2. Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khranov M.V. [Simple liquid nutrient medium for molecular-genetic investigations of *Francisella tularensis*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 4(102):66–7.
3. Conlan J.W., Shen H., Golovliov I., Zingmark C., Oyston P.C.F., Wangxue C., House R.V., Sjöstedt A. Differential ability of novel attenuated targeted deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* strain SCHU S4 to protect mice against aerosol challenge with virulent bacteria: Effects of host background and route of immunization. *Vaccine*. 2010; 28:1824–31.
4. Golovliov I., Sjöstedt A., Mokrievich A., Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003; 222:273–80.
5. Pechous R.D., McCarthy T.R., Zahrt T.C. Working toward the Future: Insights into *Francisella tularensis* Pathogenesis and Vaccine Development. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 2009; 73(4):684–711.
6. Twine S.M., Bystrom M., Chen W., Forsman M., Golovliov I.R., Johansson A., Kelly J., Lindgren H., Svensson K., Zingmark C., Conlan W., Sjöstedt A. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58 kDa protein is attenuated for virulence and an effective live vaccine. *Infect. Immun.* 2005; 73(12):8345–52.

Authors:

Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Mironova R.I., Kombarova T.I., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Павлов В.М. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 15.08.13.