

DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-116-122

УДК 616-07:579.841.95

Е.М. Кузнецова, С.В. Борисова, О.А. Волох, В.Г. Германчук, А.К. Никифоров

Оценка диагностической значимости кроличьих поликлональных антител к комплексным антигенам внешних мембран и секретируемым стресс-белкам *Francisella tularensis*

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Широкое распространение природных очагов туляремии на территории Российской Федерации обуславливает необходимость создания новых и совершенствования имеющихся методов иммунодиагностики возбудителя. На сегодняшний день актуальной задачей остается поиск антигенов *Francisella tularensis*, которые смогли бы обеспечить высокую чувствительность и специфичность разрабатываемых на их основе диагностических тест-систем. При этом большие надежды возлагаются на поверхностные структуры клеток тулярийного микроба (ЛПС и белки наружной мембраны) и секретируемые стресс-белки. **Цель работы** – оценка диагностической значимости кроличьих поликлональных антител к комплексным антигенам внешних мембран и секретируемым стресс-белкам тулярийного микроба. **Материалы и методы.** В работе использовали вакцинный штамм, его бескапсульный дериват, 6 вирулентных штаммов *F. tularensis* разных подвидов и биоваров, а также 10 штаммов гетерологичных микроорганизмов. Оценка диагностической значимости полученных кроличьих гипериммунных сывороток проводили с использованием иммуноферментного анализа, иммуноблоттинга, реакции микроагглютинации и непрямой гемагглютинации. В качестве образцов использовали чистые культуры микроорганизмов, суспензии органов лабораторных животных, вакцинированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ (белые мыши) и зараженных *F. tularensis* 503/840 (морские свинки). **Результаты и обсуждение.** Получены кроличьи поликлональные антитела к антигенам внешних мембран и секретируемым стресс-белкам *F. tularensis*. С помощью иммуноблоттинга определена их эпитопная направленность. Показана способность полученных поликлональных антител вступать в реакции со специфическими антигенами *F. tularensis* разных подвидов в иммунологических тестах. Установлено, что полученные антитела могут использоваться для выявления возбудителя в суспензиях органов вакцинированных и зараженных лабораторных животных. При этом наибольшей диагностической значимостью обладают антитела к сложным антигенам *F. tularensis*, в состав которых кроме белкового входит углеводный компонент клеток тулярийного микроба. Поликлональные антитела к отдельным секретируемым стресс-белкам (Bfr и GroEL/GroES) специфичны, но не позволяют выявить возбудитель при его низкой концентрации в образце, что может быть связано с разной интенсивностью экспрессии этих антигенов в процессе жизнедеятельности микроорганизма.

Ключевые слова: туляремия, антигены, антитела, иммунодиагностика.

Корреспондирующий автор: Кузнецова Екатерина Михайловна, e-mail: rusrapr@microbe.ru.

Для цитирования: Кузнецова Е.М., Борисова С.В., Волох О.А., Германчук В.Г., Никифоров А.К. Оценка диагностической значимости кроличьих поликлональных антител к комплексным антигенам внешних мембран и секретируемым стресс-белкам *Francisella tularensis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2025; 2:116–122. DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-116-122

Поступила 01.04.2025. Отправлена на доработку 19.05.2025. Принята к публикации 27.05.2025.

E.M. Kuznetsova, S.V. Borisova, O.A. Volokh, V.G. Germanchuk, A.K. Nikiforov

Assessment of the Diagnostic Significance of Rabbit Polyclonal Antibodies to Complex Antigens of Outer Membranes and Secreted Stress Proteins of *Francisella tularensis*

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. The widespread distribution of natural foci of tularemia on the territory of the Russian Federation necessitates the creation of new and improvement of existing methods of immunodiagnosics of the pathogen. To date, the search for *Francisella tularensis* antigens that could provide high sensitivity and specificity of diagnostic test systems developed on their basis remains an urgent task. At the same time, great hopes are placed on the surface structures of the cells of tularemia microbe (LPS and outer membrane proteins) and secreted stress proteins. **The aim** of the work was to evaluate the diagnostic value of rabbit polyclonal antibodies to complex antigens and secreted stress proteins of tularemia microbe. **Materials and methods.** The work used a vaccine strain, its acapsular derivative, 6 virulent strains of *F. tularensis* of different subspecies and biovars, as well as 10 strains of heterologous microorganisms. The diagnostic significance of the obtained sera was assessed using immunochemical and serological methods: enzyme immunoassay, immunoblotting, microagglutination reaction and indirect hemagglutination. Pure cultures of microorganisms and suspensions of organs from laboratory animals vaccinated with *F. tularensis* 15NIEG and infected with *F. tularensis* 503/840 were used as samples. **Results and discussion.** Polyclonal antibodies to outer membrane antigens and secreted stress proteins of *F. tularensis* have been obtained. Their epitope orientation was determined using immunoblotting. The ability of the obtained polyclonal antibodies to enter into serological reactions with specific antigens of *F. tularensis* of different subspecies in immunological tests has been demonstrated. It has been found that these antibodies can be used to detect the pathogen in organ suspensions of vaccinated and infected laboratory animals. We have established that antibodies to complex antigens of *F. tularensis*, which in addition to the protein component include the carbohydrate component of the tularemia microbe cells, have the greatest diagnostic significance. Polyclonal antibodies to individual secreted stress proteins (Bfr and GroEL/GroES) are specific, but do not allow identifying the pathogen at its low concentration in the sample, which may be due to different intensities of expression of these antigens during the life of the microorganism.

Key words: tularemia, antigens, antibodies, immunodiagnostics.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Bioethics: All work with animals was carried out in accordance with the research protocol approved by the bioethics commission of the Federal State Scientific Institution "Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor.

Corresponding author: Ekaterina M. Kuznetsova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kuznetsova E.M., Borisova S.V., Volokh O.A., Germanchuk V.G., Nikiforov A.K. Assessment of the Diagnostic Significance of Rabbit Polyclonal Antibodies to Complex Antigens of Outer Membranes and Secreted Stress Proteins of *Francisella tularensis*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2025; 2:116–122. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-116-122
Received 01.04.2025. Revised 19.05.2025. Accepted 27.05.2025.

Kuznetsova E.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0441-9269>
Borisova S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3793-6526>
Volokh O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>

Germanchuk V.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8986-3640>
Nikiforov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1130-3504>

Francisella tularensis – возбудитель туляремии, способный вызывать вспышки заболевания среди людей и животных, включен в категорию А как потенциальный агент биотерроризма [1]. Легочная форма туляремии является наиболее опасной для человека, для нее характерны высокая заболеваемость и смертность до 2 % даже у пациентов, получающих антибиотикотерапию [2, 3]. Широкое распространение природных очагов этого заболевания на территории Российской Федерации указывает на актуальность создания новых и совершенствования имеющихся методов иммунодиагностики туляремии [4–6]. Для решения этой задачи важным критерием является подбор антигенов, которые смогли бы обеспечить высокую чувствительность и специфичность разрабатываемых тест-систем.

При получении высокоактивных специфичных антител для детекции возбудителя туляремии в качестве иммунизирующих агентов используют в основном поверхностные структуры бактериальных клеток *F. tularensis* (ЛПС, белки наружной мембраны, стресс-белки) или цельные клетки бактерий [6, 7]. Ранее авторами была разработана технология выделения иммунобиологически активных компонентов внешних мембран туляремийного микроба с учетом особенностей химической и антигенной структуры клеток и участия определенных антигенных комплексов в процессах иммуногенеза [8], а также способ выделения секретируемых стресс-белков при сохранении их нативной природы [9]. Из клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ были получены следующие антигены: протективный антигенный комплекс (ПАК) и гликозилированный белковый комплекс (Bfr-O); из культуральной жидкости получены секретируемые антигены: комплекс белков-шаперонов (HSP), стресс-белок Bfr и комплекс белков GroEL/GroES.

Цель работы – провести оценку диагностической значимости кроличьих поликлональных антител к комплексным антигенам и секретируемым стресс-белкам туляремийного микроба.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* subsp. *ho-*

larctica KM 9 (Cap⁻); *F. tularensis* subsp. *holarctica* биовар eryR 503/840, *F. tularensis* subsp. *holarctica* биовар eryS KM-3 (21-И); *F. tularensis* subsp. *holarctica* биовар japonica Kosho, *F. tularensis* subsp. *nearctica* B-399 A-cole; *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61 (117); *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112, *Yersinia pestis* EV, *Y. pseudotuberculosis* I–VI сероваров, *Salmonella typhi abdominalis* 97723, *Shigella sonnei* 714, *Escherichia coli* 25922 ATCC, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов I–IV групп патогенности ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов, Россия). Штаммы *F. tularensis* выращивали на плотной питательной среде FT-агар (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) при 37 °C и инактивировали в соответствии с СанПиН 3.3686-21. Агаровые культуры гетерологичных микроорганизмов инактивировали кипячением в течение 30 мин.

Препараты ПАК, Bfr-O, Bfr, HSP и GroEL/GroES получали из вакцинного штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ по методикам, описанным ранее [8, 9].

Для получения сывороток в качестве животных-продуцентов использовали взрослых (2,5–3 кг) кроликов породы шиншилла. Иммунизацию животных проводили антигенами, конъюгированными с наночастицами золота (ЗНЧ), по предложенной ранее схеме [10]. В качестве адъюванта использовали неполный адъювант Фрейнда в объемном соотношении 1:1, иммунизацию проводили подкожно четырехкратно с интервалом 14 дней. Далее через 14 дней проводили двукратное бустирование, которое заключалось во введении животным-продуцентам не связанного с ЗНЧ антигена в концентрации 900 мкг по белку, комбинируя внутривенный и подкожный способы с интервалом 7–10 дней и контролируя продукцию антител с помощью непрямого дот-иммуноанализа.

Иммуноглобулиновую фракцию из сывороток крови выделяли сульфатным методом. Титр специфических антител оценивали в реакции непрямого гемагглютинации (РНГА), используя отечественный коммерческий набор «РНГА-Тул-Аг-СтаВНИПЧИ». Концентрацию белка в препаратах антител определяли спектрофотометрически по формуле: $C = A_{280} \cdot 0,71$, где A_{280} – концентрация при длине волн 280 нм, а 0,71 – коэффициент, рассчитанный для IgG [11].

Постановку реакции микроагглютинации (РМА) осуществляли с использованием клеток штаммов *F. tularensis* разных подвигов, окрашенных сафранином [12]. При постановке РМА исследуемые иммуноглобулины в количестве 0,025 мл вносили в 96-луночные полимерные планшеты для иммунологических реакций («Медполимер», Санкт-Петербург, Россия) и титровали в 0,85 % растворе NaCl (pH 7,2), начиная с разведения 1/5 с шагом 2 в том же объеме. В качестве отрицательного контроля использовали 0,85 % раствор NaCl (pH 7,2). В каждую лунку добавляли по 0,025 мл окрашенных сафранином бактериальных клеток. Содержимое планшетов осторожно перемешивали и инкубировали при 37 °C в течение 18 ч. Учет результатов проводили визуально.

Иммуноблоттинг проводили по методу Н. Towbin et al. [13] после SDS-PAGE электрофореза в 12,5%-м разделительном геле. Для анализа использовали формализированную бактериальную взвесь в концентрации $1,0 \cdot 10^{10}$ м.к./мл, которую обрабатывали ультразвуком в установке Sony prer 150 plus (MSE, Великобритания) в течение 1 мин. Электроперенос на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) осуществляли в трис-глициновом буфере (pH 8,3) при 350 мА в течение 1 ч на приборе Mini Trans-Blot (Bio-Rad, США). После блокировки в 3 % БСА на TBS-буфере (pH 7,4) мембрану инкубировали с исследуемыми иммуноглобулинами в течение 30 мин при 37 °C. Для проявления нитроцеллюлозных реплик использовали антикроличьи антитела, меченные пероксидазой (Sigma-Aldrich, США) и О-дианизидин (Fluka, Швейцария).

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили общепринятым способом. В качестве конъюгата использовали антивидовые антитела, меченные пероксидазой (Sigma-Aldrich, США). Субстратным раствором служил 2,2 % АБТС (Sigma-Aldrich, США) в 0,1М цитратном буфере (pH 4,0). Для анализа связывающей активности полученных антителых препаратов с клетками туляремийного микроба методом непрямого ИФА планшеты сенсibilizировали клетками различных штаммов микроорганизмов в концентрации 0,03 ОП₆₀₀/мл, после чего вносили серийные разведения исследуемых антител. Учет и оценку результатов ИФА проводили с использованием фотометра планшетного iMark II (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм. Проба считалась положительной, если ее оптическая плотность в 2 раза и более превосходила наивысшее значение оптической плотности отрицательных контролей.

Для выявления туляремийного антигена в макроорганизме при вакцинации использовали 30 белых мышей, а при экспериментальной туляремии – 12 морских свинок. Белым мышам вводили 100 м.к. вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1LD₅₀ = 25059 м.к.). Для анализа использовали селезенку, забор проб осуществляли на 7, 14, 21, 30 и 45-е сутки по 5 животных на каждый срок. Заражение морских свинок проводили однократно подкожно

в дозе 100 м.к. вирулентного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 (1LD₅₀ = 3 м.к.) и исследовали после их гибели в разные сроки. Для анализа использовали печень и селезенку подопытных животных. В обоих случаях контролем служили интактные животные. Анализ обсемененности органов проводили бактериологическим методом. Для ИФА готовили 10 % суспензии органов в 0,85 % растворе NaCl (pH 7,2), инактивированные в соответствии с СанПиН 3.3686-21. Образцы суспензий органов животных для освобождения от клеточного дебриса центрифугировали при 1200 об/мин в течение 2 мин, супернатант исследовали в ИФА.

Все работы с животными проводили в соответствии с протоколом исследований, утвержденным биоэтической комиссией ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, в условиях вивария с уровнем биологической безопасности BSL 3.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью программы Excel. При анализе и обобщении результатов вычисляли среднюю арифметическую, стандартную ошибку средней арифметической ($P < 0,05$) $M \pm m$.

Результаты и обсуждение

При определении в РНГА активности выделенных из гипериммунных кроличьих сывороток иммуноглобулиновых фракций (Ig) титр специфических антител к ПАК составил 1/2560, к Bfr-O – 1/2560, к Bfr – 1/160, к HSP – 1/640, к GroEL/GroES – 1/640.

На первом этапе исследований проведена работа по определению антигенной специфичности полученных поликлональных антител. Для этого использовали метод иммуноблоттинга, который позволил определить эпитопную направленность антител к антигенным фракциям клеток штаммов *F. tularensis* разных подвигов. В результате установлено, что Ig к ПАК содержат специфические антитела к семи мажорным антигенным фракциям с молекулярными массами от 81 до 10 кДа, Ig к Bfr-O – к двум антигенным фракциям с молекулярными массами 41–43 и 14–17 кДа, Ig к Bfr – к антигенной фракции с молекулярной массой 14–17 кДа, Ig к HSP – к пяти антигенным фракциям с молекулярными массами от 81 до 16 кДа, а Ig к GroEL/GroES – к двум антигенным фракциям с молекулярными массами 58–60 и 14–16 кДа (табл. 1).

Способность полученных поликлональных антител взаимодействовать с ЛПС *F. tularensis* оценивали с помощью коммерческой тест-системы для выявления антител против ЛПС туляремийного микроба методом иммуноблоттинга Serablot Anti-*Francisella tularensis* (Seramun, Германия). В качестве конъюгата использовали антикроличьи антитела, меченные пероксидазой (Sigma-Aldrich, США). Установлено, что Ig к ПАК взаимодействуют с ЛПС *F. tularensis* и окрашивают на тесте все полосы в виде лестни-

Таблица 1 / Table 1

Спектр антител к антигенным фракциям *F. tularensis* разных подвидов
Spectrum of antibodies to antigenic fractions of *F. tularensis* of different subspecies

Поликлональные антитела Polyclonal antibodies	Иммунизирующий антиген Immunizing antigen	Взаимодействие с антигенными фракциями (молекулярная масса, кДа) Interaction with antigen fractions (molecular weight, kDa)			
		subsp. <i>holarctica</i>	subsp. <i>mediasiatica</i>	subsp. <i>nearctica</i>	subsp. <i>novicida</i>
Ig 1	ПАК / PAC	81–85, 57–60, 41–43, 30–32, 19–21, 16–17, 10–12	81–85, 57–60, 41–43, 30–32, 19–21, 16–17, 10–12	81–85, 57–60, 41–43, 30–32, 19–21, 16–17, 10–12	81–85, 57–60, 41–43, 30–32, 19–21, 16–17, 10–12
Ig 2	Bfr-O	41–43, 14–17	41–43, 14–17	41–43, 14–17	41–43, 14–17
Ig 3	Bfr	14–17	14–17	14–17	14–17
Ig 4	HSP	72–81, 56–60, 35–36, 21–24, 16–17	72–81, 56–60, 35–36, 21–24, 16–17	72–81, 56–60, 35–36, 21–24, 16–17	72–81, 56–60, 35–36, 21–24, 16–17
Ig 5	GroEL/GroES	58-60, 14-16	58-60, 14-16	58–60, 14–16	58–60, 14–16

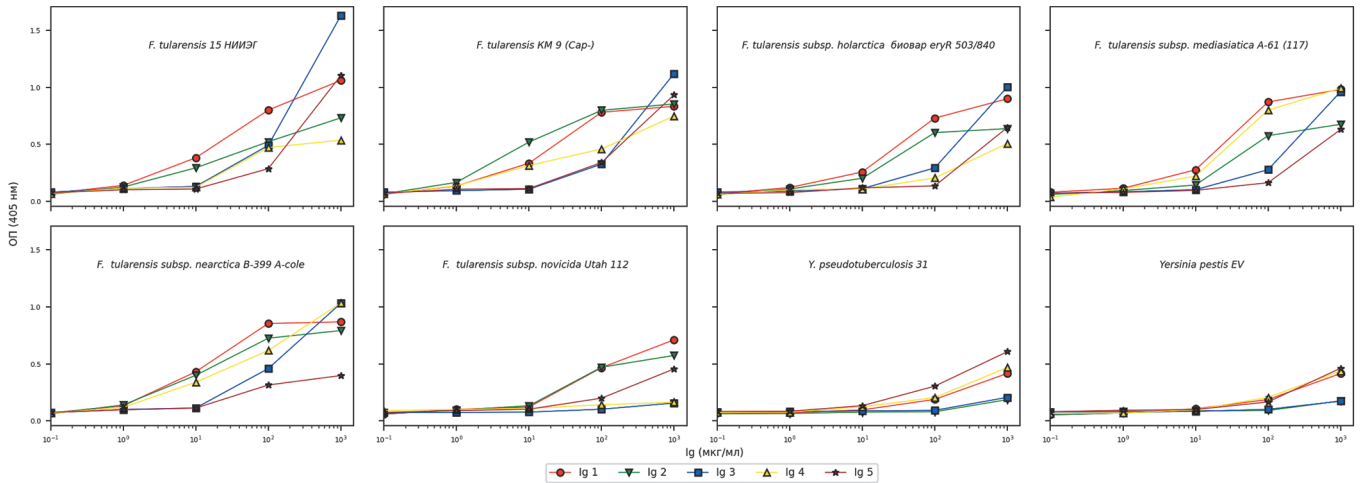
цы, что указывает на положительный результат. При использовании Ig к Bfr, Bfr-O, HSP и GroEL/GroES результат теста был отрицательным.

На следующем этапе проведен анализ способности полученных поликлональных антител вступать в реакцию агглютинации с клетками *F. tularensis* разных подвидов и биоваров. Оценку способности полученных иммуноглобулинов к агглютинации клетками *F. tularensis* проводили с помощью РМА. При этом установлено, что Ig к ПАК, Bfr-O, HSP и GroEL/GroES агглютинируются клетками *F. tularensis* разных подвидов и биоваров (титр 1/4 – 1/128) и клетками Cap⁻штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* KM 9 в титре 1/4 – 1/16. Тогда как Ig к Bfr агглютинируются клетками *F. tularensis* основных подвидов (титр 1/2 – 1/4) и не агглютинируются штаммом *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 и *F. tularensis* subsp. *holarctica* KM 9.

При проведении непрямого ИФА установлено, что все исследуемые антитела вступают в реакцию специфического взаимодействия с клетками *F. tularensis* всех подвидов и биоваров. При этом стоит отметить, что Ig к Bfr-O требовали в два раза более вы-

соких концентраций для эквивалентного связывания с клетками *F. tularensis* subsp. *holarctica* и subsp. *mediasiatica*, чем Ig к ПАК, HSP и GroEL/GroES. А Ig к Bfr обладали большей чувствительностью в ИФА по сравнению с другими антителами, но плохо связывались со штаммом subsp. *novicida* (рисунок). Все иммуноглобулины в ИФА были способны связываться с бескапсульным штаммом туляремии микроба. Специфичность связывания поликлональных антител контролировали с помощью взвесей *Yersinia pestis* EV и *Yersinia pseudotuberculosis* 31. В результате установлено, что при постановке непрямого ИФА оптимальная концентрация Ig к Bfr-O и Bfr составляет 100 мкг/мл и ниже, а концентрация Ig к ПАК, HSP и GroEL/GroES – 10 мкг/мл и ниже (рисунок).

Определение чувствительности и специфичности иммуноглобулинов в непрямом ИФА проводили на панели из 10 штаммов *F. tularensis* разных подвидов и биоваров и 9 штаммов гетерологичных микроорганизмов. В результате установлено, что чувствительность метода для чистых культур *F. tularensis* голарктического, неарктического и среднеазиатского подвидов при использовании Ig к ПАК в



Способность поликлональных антител к ПАК (Ig 1), Bfr-O (Ig 2), Bfr (Ig 3), HSP (Ig 4) и GroEL/GroES (Ig 5) связываться с клетками *F. tularensis* разных подвидов и биоваров и гетерологичными микроорганизмами в непрямом ИФА

The ability of polyclonal antibodies to PAC (Ig 1), Bfr-O (Ig 2), Bfr (Ig 3), HSP (Ig 4) and GroEL/GroES (Ig 5) to bind to *F. tularensis* cells of different subspecies and biovars and strains of heterologous microorganisms in indirect ELISA

Таблица 2 / Table 2

Результаты обнаружения антигенов туляремийного микроба в суспензии селезенки иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ белых мышей

Results of detection of tularemia microbe antigens in the spleen suspension of white mice immunized with the *F. tularensis* 15 NIEG vaccine strain

Срок жизни, сут Lifespan, days	Количество исследованных проб Number of samples examined	Количество положительных результатов Number of positive results					
		Бактериологический метод Bacteriological method	ИФА Ig ПАК ELISA Ig PAC	ИФА Ig Bfr-O ELISA Ig Bfr-O	ИФА Ig Bfr ELISA Ig Bfr	ИФА Ig HSP ELISA Ig HSP	ИФА Ig GroEL/GroES ELISA Ig GroEL/GroES
7	5	5	3	3	0	5	3
14	5	4	3	4	2	4	4
21	5	2	4	4	2	4	4
30	5	0	4	4	4	5	4
45	5	0	5	5	4	5	4
Всего проб Total samples	25	11	19	20	12	23	19
Контроль Control	5	0	0	0	0	0	0

среднем составила $(3,8 \pm 0,2) \cdot 10^6$ м.к./мл, Ig к Bfr-O – $(4,0 \pm 0,8) \cdot 10^6$ м.к./мл, Ig к Bfr – $(4,7 \pm 0,6) \cdot 10^6$ м.к./мл, Ig к HSP – $(6,8 \pm 0,5) \cdot 10^6$ м.к./мл и Ig к GroEL/GroES – $(1,6 \pm 0,6) \cdot 10^7$ м.к./мл. Клетки штамма *F. tularensis* subsp. *novicida* выявлялись при использовании Ig к ПАК, Bfr-O, HSP и GroEL/GroES в концентрации $(9,5 \pm 0,5) \cdot 10^7$ м.к./мл, тогда как Ig к Bfr не взаимодействовал в непрямом ИФА с подвидом новицида. При этом Ig к Bfr и Ig к Bfr-O обладали 100 % специфичностью по отношению ко всем исследуемым культурам гетерологичных микроорганизмов в концентрации 10^9 м.к./мл, а Ig к ПАК, HSP и GroEL/GroES – в концентрации 10^8 м.к./мл.

При определении специфичности полученных поликлональных антител по отношению к антигенам установлено, что Ig к ПАК и HSP взаимодействуют со всеми исследуемыми антигенами, выявляя Bfr и Bfr-O до концентрации 10 нг/мл, GroEL/GroES – до 100 нг/мл, а ПАК и HSP – до 0,1 пг/мл. Наибольшей специфичностью обладают Ig к GroEL/GroES, которые не вступают во взаимодействие с Bfr и Bfr-O, не имеющими эпитопов связывания с данными антителами, но связываются с ПАК-15 и HSP до концентрации 0,01 нг/мл, а с GroEL/GroES – до 0,01 пг/мл.

Последний этап работы заключался в проведении эксперимента по определению возможности использования полученных поликлональных антител в непрямом ИФА для детекции возбудителя туляремии в органах вакцинированных и зараженных животных. Исследование суспензии селезенки от 25 вакцинированных белых мышей показало, что антигены возбудителя туляремии обнаруживаются в ИФА при использовании Ig ПАК в 19 пробах (76 %), Ig Bfr-O – в 20 пробах (80 %), Ig Bfr – в 12 пробах (48 %), Ig HSP – в 23 пробах (92 %), Ig GroEL/GroES – в 19 пробах (76 %), бактериологическим методом – в 11 пробах (44 %) (табл. 2). Во всех случаях при исследовании органов интактных животных получены отрицательные результаты.

При исследовании 27 проб от морских свинок, зараженных штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840, антигены возбудителя туляремии обнаружены в непрямом ИФА с использованием Ig ПАК и Ig Bfr-O в 87 % проб, Ig Bfr – в 44 %, Ig HSP – в 67%, Ig GroEL/GroES – в 61 % (табл. 3). При этом чаще антиген обнаруживался в суспензиях селезенки (73 %), чем в суспензиях печени (62 %). Бактериологическим методом культура возбудителя туляремии выделена в 50 % проб от животных.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что наибольшей диагностической значимостью обладают поликлональные антитела, полученные к сложным антигенам, таким как ПАК, Bfr-O и HSP, которые имеют в своем составе несколько белков или сочетание белков и углеводных компонентов клеток *F. tularensis*. Поликлональные антитела к данным антигенам позволяют идентифицировать штаммы *F. tularensis* независимо от их подвидовой принадлежности и наличия капсулы. Антигены к ПАК, Bfr-O и HSP туляремийного микроба выявляются у вакцинированных и зараженных *F. tularensis* лабораторных животных как на ранних, так и на более поздних сроках развития вакцинного или инфекционного процессов. Поликлональные антитела к отдельным секретируемым стресс-белкам (Bfr и GroEL/GroES) более специфичны, но не позволяют выявить возбудитель при низкой его концентрации в образце, что, по-видимому, связано с разной интенсивностью экспрессии этих антигенов в процессе жизнедеятельности микроорганизма *in vitro* и *in vivo*. В дальнейшем будет разработан «сэндвич»-вариант ИФА на основе охарактеризованных иммуноглобулинов к комплексным антигенам и секретируемым стресс-белкам *F. tularensis* для детекции возбудителя.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Таблица 3 / Table 3

Результаты сравнительного исследования на наличие антигенов туляремийного микроба в суспензиях органов морских свинок после заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840

Results of a comparative study on the presence of tularemia microbe antigens in organ suspensions of guinea pigs after infection with the virulent strain *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840

Срок жизни, сут Lifespan, days	Характер материала Nature of the material	Количество исследованных проб Number of samples examined	Количество положительных результатов Number of positive results					
			ИФА Ig ПАК ELISA Ig PAC	ИФА Ig Bfr-O ELISA Ig Bfr-O	ИФА Ig Bfr ELISA Ig Bfr	ИФА Ig HSP ELISA Ig HSP	ИФА Ig GroEL/GroES ELISA Ig GroEL/GroES	Бактерио- логический метод Bacteriological method
6,5±1,0	Печень Liver	3	3	3	0	2	0	3
	Селезенка Spleen	3	3	3	3	3	2	3
12,3±0,5	Печень Liver	3	3	3	1	2	3	2
	Селезенка Spleen	3	2	2	2	2	3	2
18,7±2,8	Печень Liver	3	2	2	1	1	2	0
	Селезенка Spleen	3	2	2	1	2	1	0
Всего проб Total samples	Печень Liver	9	8	8	2	5	5	5
	Селезенка Spleen	9	7	7	6	7	6	5
Контроль Control	Печень Liver	3	0	0	0	0	0	0
	Селезенка Spleen	3	0	0	0	0	0	0

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Биоэтика. Все работы с животными проводили в соответствии с протоколом исследований, утвержденным биоэтической комиссией ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Список литературы

1. Maurin M. *Francisella tularensis* as a potential agent of bio-terrorism? *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 2015; 13(2):141–4. DOI: 10.1586/14787210.2015.986463.

2. Nelson C.A., Sjöstedt A. Tularemia: a storied history, an ongoing threat. *Clin. Infect. Dis.* 2024; 78(Suppl 1):S1–S3. DOI: 10.1093/cid/ciad681.

3. Uriel Valladares P., Opota O., Beigelman-Aubry C., Bochud P.Y., Lamothe F. *Tularémie pulmonaire: un diagnostic à ne pas manquer* [Pulmonary tularemia: a diagnosis not to be missed]. *Rev. Med. Suisse.* 2022; 18(777):707–11. DOI: 10.53738/REVMED.2022.18.777.707.

4. Жарникова И.В., Ефременко В.И., Жарникова Т.В., Курчева С.А., Кальной С.М., Ефременко Д.В., Исакова А.А., Инденбом А.В. Серологические методы выявления возбудителя туляремии и их оценка. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2019; (4):32–8. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-4-32-38.

5. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Куликалова Е.С., Холин А.В., Мазепа А.В., Борзенко М.А., Пичурина Н.Л., Павлович Н.В., Носков А.К., Транквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Множественная лекарственная устойчивость клеток *F. tularensis* subsp. *holarctica*, анализ эпи-

зоотологической и эпидемиологической ситуации по туляремии на территории Российской Федерации в 2022 г. и прогноз на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023; (1):37–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-37-47.

6. Hannah E.E., Pandit S.G., Hau D., DeMers H.L., Robichaux K., Nualnoi T., Dissanayaka A., Arias-Umana J., Green H.R., Thorkildson P., Pflughoeft K.J., Gates-Hollingsworth M.A., Ozsurekci Y., AuCoin D.P. Development of immunoassays for detection of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide in tularemia patient samples. *Pathogens.* 2021; 10(8):924. DOI: 10.3390/pathogens10080924.

7. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Алиева Е.В., Курчева С.А., Гаркуша Ю.Ю. Антигены и антисыворотки *Francisella tularensis*: к вопросу иммунодиагностики туляремии. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2012; (1):49–52.

8. Кузнецова Е.М., Борисова С.В., Волох О.А., Никифоров А.К. Комплексный методический подход для выделения иммунобиологически активных антигенных компонентов внешних мембран туляремийного микроба. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова.* 2019; 15(4):41–9.

9. Борисова С.В., Волох О.А., Киреев М.Н., Кузнецова Е.М. Способ получения секретируемых стресс-белков *Francisella tularensis*. Патент РФ № 2830065, опубл. 12.11.2024. Бюл. № 32.

10. Дыкман Л.А., Волох О.А., Кузнецова Е.М., Никифоров А.К. Иммуногенность конъюгатов протективных антигенных комплексов туляремийного микроба с наночастицами золота. *Российские нанотехнологии.* 2018; 13(7-8):36–43. DOI: 10.1134/S1995078018040055.

11. Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 1995; 4(11):2411–23. DOI: 10.1002/pro.5560041120.

12. Sato T., Fujita H., Ohara Y., Homma M. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(10):2372–4. DOI: 10.1128/jcm.28.10.2372-2374.1990.

13. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:

procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1979; 76(9):4350–4.

References

1. Maurin M. *Francisella tularensis* as a potential agent of bioterrorism? *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 2015; 13(2):141–4. DOI: 10.1586/14787210.2015.986463.
2. Nelson C.A., Sjöstedt A. Tularemia: a storied history, an ongoing threat. *Clin. Infect. Dis.* 2024; 78(Suppl 1):S1–S3. DOI: 10.1093/cid/ciad681.
3. Uriel Valladares P., Opota O., Beigelman-Aubry C., Bochud P.Y., Lamothe F. *Tularémie pulmonaire: un diagnostic à ne pas manquer* [Pulmonary tularemia: a diagnosis not to be missed]. *Rev. Med. Suisse*. 2022; 18(777):707–11. DOI: 10.53738/REVMED.2022.18.777.707.
4. Zharnikova I.V., Efremenko V.I., Zharnikova T.V., Kurcheva S.A., Kalnoy S.M., Efremenko D.V., Isakova A.A., Indenbom A.V. [Serological methods for detection of the causative agent of tularemia and their evaluation]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2019; (4):32–8. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-4-32-38.
5. Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Kulikalova E.S., Kholin A.V., Mazepa A.V., Borzenko V.A., Pichurina N.L., Pavlovich N.V., Noskov A.K., Trankvilevsky D.V., Khramov M.V., Dyatlov I.A. [Multidrug resistance of *F. tularensis* subsp. *holarctica*, epizootiological and epidemiological analysis of the situation on tularemia in the Russian Federation in 2022 and forecast for 2023]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; (1):37–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-37-47.
6. Hannah E.E., Pandit S.G., Hau D., DeMers H.L., Robichaux K., Nualnoi T., Dissanayaka A., Arias-Umana J., Green H.R., Thorkildson P., Pflughoeft K.J., Gates-Hollingsworth M.A., Ozsurekci Y., AuCoin D.P. Development of immunoassays for detection of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide in tularemia patient samples. *Pathogens*. 2021; 10(8):924. DOI: 10.3390/pathogens10080924.
7. Tyumentseva I.S., Afanasyev E.N., Alieva E.V., Kurcheva S.A., Garkusha Y.Y. [Antigens and antisera of *Francisella tularensis*: on the issue of tularemia immunodiagnosis]. *Meditinskii Vestnik Severnogo Kavkaza* [Medical News of the North Caucasus]. 2012; (1):49–52.
8. Kuznetsova Ye.M., Borisova S.V., Volokh O.A., Nikiforov A.K. [An integrated methodological approach for the isolation of immunobiologically active antigenic components of the outer membranes of tularemia microbe]. *Vestnik Biotekhnologii i Fiziko-Khimicheskoi Biologii im. Yu.A. Ovchinnikova* [Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov]. 2019; 15(4):41–9.
9. Borisova S.V., Volokh O.A., Kireev M.N., Kuznetsova E.M. Method of producing secreted stress proteins of *Francisella tularensis*. RF Patent No. 2830065, publ. 12.11.2024. Bull. No. 32.
10. Dykman L.A., Volokh O.A., Kuznetsova E.M., Nikiforov A.K. [Immunogenicity of conjugates of protective antigen complexes of tularemia microbe with gold nanoparticles]. *Rossiiskie Nanotekhnologii* [Nanotechnologies in Russia]. 2018; 3(7–8):384–92. DOI: 10.1134/S1995078018040055.
11. Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 1995; 4(11):2411–23. DOI: 10.1002/pro.5560041120.
12. Sato T., Fujita H., Ohara Y., Homma M. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(10):2372–4. DOI: 10.1128/jcm.28.10.2372-2374.1990.
13. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1979; 76(9):4350–4.

Authors:

Kuznetsova E.M., Borisova S.V., Volokh O.A., Germanchuk V.G., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Кузнецова Е.М., Борисова С.В., Волох О.А., Германчук В.Г., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.