

Е.М.Кузнецова, О.А.Волох, Н.Г.Авдеева, Ю.И.Самохвалова

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА ИЗ *FRANCISELLA TULARENSIS* SUBSP. *NOVICIDA*

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

F. tularensis subsp. *novicida*, ранее рассматриваемый как представитель отдельного вида, был причислен к разновидностям *F. tularensis* относительно недавно на основании сравнительного анализа 16S-рибосомальной РНК франциселл. Подвид subsp. *novicida* может вызывать заболевания у людей только со сниженным иммунным статусом и обладает сниженной вирулентностью для кроликов. Несмотря на это, установлена высокая степень гомологии нуклеотидной последовательности внутривидовых таксонов *F. tularensis*. **Цель исследования:** выделение протективного поверхностного антигенного комплекса из клеток *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 (ATTC 15 482) и изучение его свойств. **Материалы и методы.** Концентрацию белков, углеводов, липидов в антигенном препарате определяли общепринятыми колориметрическими методами, SDS-PAGE проводили по методу U.Laemmli, а иммуноблоттинг – по методу H.Towbin. Для очистки препарата и определения его молекулярной массы применяли колоночную хроматографию, для определения иммунохимической активности – иммуноферментный анализ. Иммуногенность полученного препарата изучали на беспородных белых мышах, рассчитывая LD₅₀ и ED₅₀ по методу Кербера. **Результаты и выводы.** В результате нашей работы был проведен сравнительный анализ физико-химических, антигенных и биохимических особенностей протективного антигенного комплекса из клеток *F. tularensis* Utah 112 по сравнению с аналогичным антигенным комплексом из вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Препарат испытан на протективность при заражении иммунизированных белых мышей вирулентным штаммом *F. tularensis* 503/840. Показаны отличия полученного препарата по структуре и составу от аналогичного антигена из вакцинного штамма-производителя, а также снижение его иммунохимической и протективной активностей.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, подвиды возбудителя туляремии, антигены, иммуногенность, протективность.

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

Е.М.Kuznetsova, O.A.Volokh, N.G.Avdeeva, Yu.I.Samokhvalova

Characteristics of the Protective Antigen Complex Obtained from *Francisella tularensis* ssp. *novicida*

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

F. tularensis ssp. *novicida*, considered earlier as a representative of a separate species, has been recently classed among *F. tularensis* variety, based on the results of comparative analysis of 16S-ribosomal RNA. Subspecies *novicida* can cause disease only in immunocompromised humans and is low virulent for rabbits. Despite this, high rate of homology of the nucleotide sequence of *F. tularensis* intraspecific taxon is established. **Objective** of the study is to obtain protective surface antigen complex from *F. tularensis* ssp. *novicida* Utah 112 (ATTC 15 482) cells and investigate its properties. **Materials and methods.** Protein, carbohydrate, and lipid content of the antigen preparation was measured using conventional colorimetric methods, SDS-PAGE was conducted according to U.Laemmli, and immunoblotting – to H.Towbin. For purification and molecular mass determination column chromatography was applied. Immune-chromatographic activity was analyzed by immune-enzyme assay. Immunogenicity of the produced preparation was tested on scrub white mice, with LD₅₀ and ED₅₀ calculated according to Karber's method. **Results and conclusions.** Carried out has been comparative analysis of physical-chemical, antigenic and bio-chemical peculiarities of the protective antigen complex obtained from *F. tularensis* Utah 112 cells and equivalent antigen complex obtained from the vaccine strain – *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Protectivity of the preparation has been tested through inoculation of the immunized white mice with virulent *F. tularensis* 503/840 strain. Demonstrated have been distinctive features of the new preparation, by structure and composition, as compared to similar antigen from the vaccine producer strain, as well as the slowdown of its immunochemical and protective activities.

Key words: *Francisella tularensis*, subspecies of tularemia agent, antigens, immunogenicity, protectivity.

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

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

Citation: Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I. Characteristics of the Protective Antigen Complex Obtained from *Francisella tularensis* ssp. *novicida*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 2:63–66. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-63-66

Согласно современной классификации род *Francisella* представлен видами *Francisella tularensis*, *Francisella philomiragia*, *Francisella hispaniensis*, *Francisella halioticida* и *Francisella noatunensis* (или *pascida*) [5, 9, 11]. На основании различий в географическом распространении, вирулентности, биохимических

свойствах бактерии вида *F. tularensis* подразделяются на четыре подвида: subsp. *holarctica*, subsp. *tularensis* (син. *nearctica*), subsp. *mediaasiatica* и subsp. *novicida* [4, 5, 11]. *F. tularensis* subsp. *novicida*, ранее рассматриваемый как представитель отдельного вида, был причислен к подвидам *F. tularensis*

относительно недавно на основании результатов сравнительного анализа 16S-рибосомальной РНК франциселл [11]. На сегодняшний день отнесение *F. novicida* к подвиду *F. tularensis* subsp. *novicida* все еще остается предметом споров и обсуждений [12].

Согласно литературным данным, в отличие от высоковирулентных подвидов *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *tularensis*, subsp. *novicida* может вызывать заболевания у людей только со сниженным иммунным статусом и обладает сниженной вирулентностью для кроликов ($LD_{50} > 10^6$ м.к.) [7, 12]. Несмотря на это, установлена высокая степень гомологии нуклеотидной последовательности (~97 %) внутривидовых таксонов *F. tularensis* [12]. По структуре ЛПС *F. tularensis* subsp. *novicida* отличается от ЛПС представителей других подвидов по составу двух сахаров в О-антигене, присутствием в коре дополнительной α -глюкозы, а в липиде А наличием галактозамина [10].

Низкая вирулентность и инфекционность туляремийного микроба подвида новицида, его высокая генетическая идентичность с высоковирулентными штаммами *F. tularensis*, способность вызывать заболевание у лабораторных животных указывают на возможность его использования в качестве штамма-продуцента при получении иммунологически активных поверхностных антигенов туляремийного микроба и их комплексов. В связи с этим, целью данной работы явилось выделение протективного поверхностного антигенного комплекса (ПАК) из штамма *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112 и изучение его свойств в сравнении с препаратом ПАК из вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ (ПАК-15).

Материалы и методы

В работе использовали типовой штамм *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112 (АТТС 15 482), полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Препарат ПАК получали из биомассы 48-часовой агаровой культуры, инактивированной фенолом по методике, отработанной для вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ [2].

Анализ химического состава антигенных препаратов проводили колориметрическими методами: концентрацию белка определяли по Лоури при длине волны 750 нм [13] с применением набора реактивов «Bio-Rad DC Protein Assay» (США). Углеводы регистрировали по реакции с тимоловым реактивом при длине волны 509 нм. Количество липидов определяли бихроматным методом при длине волны 650 нм [8].

Колоночную хроматографию проводили на хроматографе низкого давления Biologic LP фирмы «Bio-RAD» (США). Колонку (120×1 см, носитель Sephacryl S-300) предварительно калибровали с использованием набора маркеров молекулярного веса от 29 до 669 кДа («Sigma», США). В качестве элюирующего буфера использовали 10 мМ Na-фосфатный буферный раствор, pH 7,0. На колонку наносили

0,5 мл образца в концентрации 10 мг/мл по сухому весу, скорость элюции составила 0,4 мл/мин.

Вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) проводили по методу Laemmli в трис-глициновом буфере (pH 8,3) на приборе «Mini-Protean II» фирмы «Bio-Rad» (США), используя 12,5 % разделяющий и 4 % концентрирующий гели. Нагрузка на гелевую дорожку составляла 20–40 мкг антигена по сухому весу. Для обнаружения белков в SDS-PAGE использовали окраску Кумасси синим R-250 (ДиаЭМ, Германия), для выявления полисахаридов гели окрашивали азотнокислым серебром с помощью набора реактивов фирмы «Bio-Rad Silver Stain» (США). Определение молекулярной массы фракций протеинов проводили по калибровочному графику зависимости логарифмов молекулярной массы от величины относительного пробега [6] с набором калибровочных белков фирмы «Fermentas» (США). Электрофоретический перенос белковых фракций из полисахаридного геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили по методу Towbin в трис-глициновом буфере (pH 8,3) на приборе «Mini Trans-Blot» фирмы «Bio-Rad» (США). При постановке иммуноблоттинга в качестве специфических антител использовали экспериментальные поликлональные кроличьи антитела к ПАК в разведении 1:100, а в качестве конъюгата – антикроличьи антитела, меченные пероксидазой (производства ИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН).

Для определения иммунохимической активности препарата протективного антигенного комплекса применяли иммуноферментный анализ (ИФА) и dot-иммуноанализ (ДИА) с экспериментальными поликлональными антителами к ПАК туляремийного микроба в разведении 1/1000 и 1/100 соответственно.

Иммуногенность полученных препаратов оценивали на модели беспородных белых мышей (19±1 г). Среднюю заражающую дозу (LD_{50}) вирулентного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 и среднюю иммунизирующую дозу (ED_{50}) антигенных препаратов рассчитывали по методу Кербера. Работу с животными проводили по стандартным методикам [7]. Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента, доверительный интервал устанавливали при вероятности 95 %.

Результаты и обсуждение

Ранее нами показано, что ПАК-15 представляет собой антиген сложной химической природы, в состав которого входят белки, липиды и углеводы в соотношении 3:1:1 [3]. При получении препарата ПАК из штамма *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112 отмечено снижение изоточки его выделения с 4,3 до 3,8. Биохимический анализ препарата ПАК из *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112 (ПАК-Utah) показал, что по составу он отличается от ПАК-15. В частности, отмечено преобладание углеводной части

Состав и иммунохимические свойства препаратов ПАК, полученных из вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и subsp. *novicida* Utah 112 (M±mt)

Препараты ПАК	Химический состав, %			Активность, нг/мл	
	Белки	Углеводы	Липиды	ДИА	ИФА
ПАК-15	63,1±3,9	10,9±1,6	23,0±2,4	20,0±6,9	0,6±0,4
ПАК-Utah	45,5±4,1	26,5±1,2	24,5±3,1	99,3±8,3	2,0±0,9

на (70±3) % и снижение иммунохимической активности в ИФА и ДИА в 5 раз (таблица). Учитывая полученные данные, можно отметить, что иммунохимическая активность препаратов ПАК связана с содержанием в них белка. Коэффициент корреляции Пирсона равен единице [1].

Электрофоретический белковый профиль ПАК-Utah отличался от ПАК-15 наличием субъединиц с молекулярной массой более 110 кДа (не активных в иммуноблоттинге) и отсутствием иммунореактивных белков в диапазоне от 50 до 90 кДа. Окраска электрофореграммы азотнокислым серебром показала наличие в препаратах ПАК-Utah и ПАК-15 компонентов липополисахаридной природы, представленных липидом А и боковыми цепями (рис. 1).

Установлено, что ПАК-15 хроматографически гомогенен, представлен одним мажорным пиком с молекулярной массой около 280 кДа. Профиль препарата ПАК-Utah имел два пика с молекулярными массами около 280 и 160 кДа, что свидетельствует о двухкомпонентном составе препарата из *F. tularensis* subsp. *novicida* (рис. 2).

Все полученные после гель-хроматографии пики препаратов ПАК-15 и ПАК-Utah проанализированы в ДИА и иммуноблоттинге. Для препарата ПАК-15 установлено наличие всех иммунодоминантных белков в основном пике. Активность в ДИА коррелировала с концентрацией белка и составляла в среднем 1/1000 для мажорного пика и 1/10 для минорного.

Тогда как для ПАК-Utah состав пиков отличался: в первом были белки более 43 кДа, а во втором – менее 23 кДа. Несмотря на это активность в ДИА в обоих случаях равна 1/100.

Изучение протективных свойств препарата ПАК из подвида *novicida* проводили на модели белых мышей, которых иммунизировали однократно подкожно с последующим заражением вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 на 21-е сутки в дозе 100 м.к. (LD₅₀ 1 м.к.). Отмечено, что выживаемость животных при иммунизации препаратом ПАК-Utah была в 2,5 раза ниже по сравнению с препаратом ПАК-15 и составила в среднем 37,5 %. Средняя иммунизирующая доза препарата ПАК-Utah составила 125,9 (66,7÷269,4) мкг, тогда как для ПАК-15 ED₅₀ = 3,1 (2,4÷11,3) мкг [2]. Патологоанатомическая картина и высевы из органов павших животных на селективные питательные среды указывали на гибель от туляремийной инфекции.

В результате проделанной работы установлены отличия препаратов ПАК-Utah и ПАК-15 по составу белковых субъединиц, количеству углеводов, молекулярной массе, иммунохимической и протективной активности. Отмеченные отличия в протективных свойствах связаны с биохимическими и иммунохимическими особенностями ПАК из подвида *novicida*. Можно предположить, что активность препаратов ПАК связана с его белковыми субъединицами с молекулярными массами в диапазоне от 57 до 85 кДа. Сниженная иммунохимическая и протективная активности ПАК-Utah делают непригодным использование данного препарата в качестве компонента разрабатываемых препаратов для профилактики и диагностики туляремии.

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

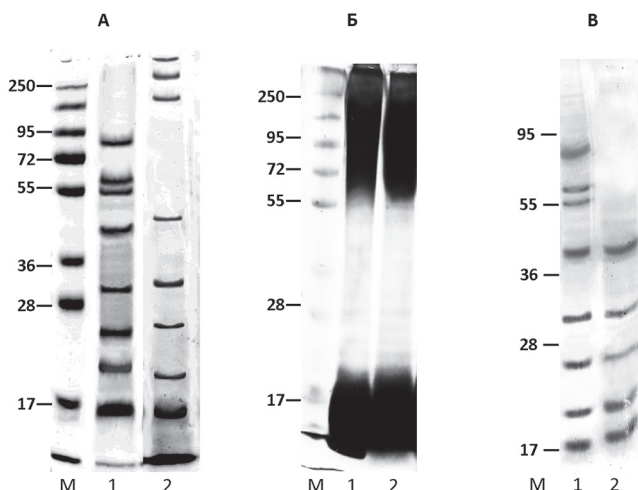


Рис. 1. SDS-PAGE-электрофорез и иммуноблоттинг препаратов ПАК, полученных из вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и subsp. *novicida* Utah 112:

А – белковый профиль (окраска Кумасси синим); Б – ЛПС-профиль (окраска азотнокислым серебром); В – иммуноблоттинг с Ig к ПАК-15 препаратов. М – маркеры молекулярной массы 11–250 кДа («Fermentas», США); 1 – ПАК-15; 2 – ПАК-Utah

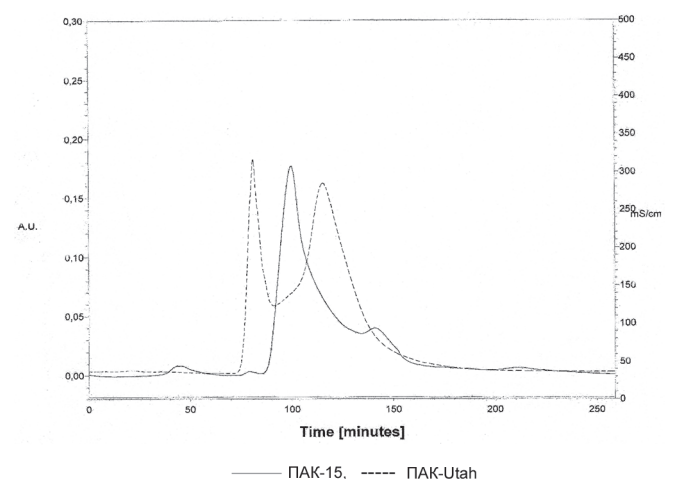


Рис. 2. Гель-хроматография препаратов ПАК, полученных из вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и subsp. *novicida* Utah 112. По оси абсцисс – время элюции, мин; по левой оси ординат – оптическая плотность элюента при 280 нм (А.у.); по правой оси ординат – электропроводность элюента мS/cm

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гмурман В.Е. Теория вероятностей и математическая статистика. М.: Высшая школа; 2004. 479 с.
2. Кузнецова Е.М., Волох О.А., Смолькова Е.А., Щуковская Т.Н., Шепелев И.А., Авдеева Н.Г., Кравцов А.Л., Никифоров А.К. Иммунобиологические свойства антигенных комплексов туляремийного микроба. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):46–9.
3. Кузнецова Е.М., Волох О.А., Шепелев И.А., Никифоров А.К. Компонентный состав протективного антигенного комплекса туляремийного микроба. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2012; 3:22–5.
4. Олсуфьев Н.Г., Мещерякова И.С. Дальнейшее изучение внутривидовой таксономии возбудителя туляремии. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1981; 10:16–21.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: ЗАО «Шико»; 2013. С. 154–90.
6. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука; 1981. 288 с.
7. Павлов В.М., Дятлов И.А. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение. М.: 2012. 267 с.
8. Amenta J. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.* 1964; 5:270–2.
9. Brevik Q.J., Ottem K.F., Kamaishi T., Watanabe K., Nylund A. *Francisella halotiocida* sp. nov. a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 2011; 111(5):1044–56. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05133.x.
10. Gunn J.S., Ernst R.K. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1105:202–18. DOI: 10.1196/annals.1409.006.
11. Huber B., Escudero R., Busse H.J., Seibold E., Scholz H.C., Anda P., Kampfer P., Spletstoesser W.D. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1995) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010; 60:1887–96. DOI: 10.1099/ijs.0.015941-0.
12. Kingry L.C., Petersen J.M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 4:35. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00035.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

References

1. Gmurman V.E. [Theory of Probability and Mathematical Statistics]. M.; 2004. 479 p.
2. Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Smol'kova E.A., Shchukovskaya T.N., Shepelev I.A., Avdeeva N.G., Kravtsov A.L., Nikiforov A.K. [Immunobiological properties of *Francisella tularensis* antigen complexes]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3(109):46–9.
3. Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Shepelev I.A., Nikiforov A.K. [Blend composition of protective antigen complex of tularemia microbe]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2012; 3:22–5.
4. Olsuf'ev N.G., Meshcheryakova I.S. [Further study of intraspecific taxonomy of tularemia agent]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1981; 10:16–21.
5. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. M.: CJSC "Shiko"; 2013. P. 154–90.
6. Osterman L.A. [Methods for Protein and Nucleic Acid Investigation: Electrophoresis and Ultracentrifugation]. M.: "Nauka"; 1981. 288 p.
7. Pavlov V.M., Dyatlov I.A. [Molecular-Genetic Investigations of *Francisella* Bacteria and Their Applicational Significance]. M.; 2012. 267 p.
8. Amenta J. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.* 1964; 5:270–2.
9. Brevik Q.J., Ottem K.F., Kamaishi T., Watanabe K., Nylund A. *Francisella halotiocida* sp. nov. a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 2011; 111(5):1044–56. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05133.x.
10. Gunn J.S., Ernst R.K. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1105:202–18. DOI: 10.1196/annals.1409.006.
11. Huber B., Escudero R., Busse H.J., Seibold E., Scholz H.C., Anda P., Kampfer P., Spletstoesser W.D. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1995) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010; 60:1887–96. DOI: 10.1099/ijs.0.015941-0.
12. Kingry L.C., Petersen J.M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 4:35. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00035.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

Authors:

Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Кузнецова Е.М., Волох О.А., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 01.12.15.