

Е.М.Кузнецова, О.А.Волох, Е.А.Смолькова, Т.Н.Щуковская, И.А.Шепелёв, Н.Г.Авдеева,
А.Л.Кравцов, А.К.Никифоров

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНТИГЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В результате проведенных исследований препаратов антигенных комплексов туляремиального микроба, полученных из штаммов-продуцентов разных подвидов (*holarctica*, *nearctica*, *mediasiatica*, *novicida*), установлено, что протективный антигенный комплекс является общим антигеном для возбудителя туляремии независимо от его подвидовой принадлежности. Полученные антигенные комплексы из штаммов голарктического, неарктического и среднеазиатского подвидов обладают сходным химическим и субъединичным составом и иммунобиологическими свойствами. Особенности строения протективного антигенного комплекса из *Francisella tularensis* subsp. *novicida*, приводят к снижению его иммуногенности и протективности по сравнению с аналогичными антигенами из других подвидов.

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

E.M.Kuznetsova, O.A.Volokh, E.A.Smol'kova, T.N.Shchukovskaya, I.A.Shepelev, N.G.Avdeeva, A.L.Kravtsov,
A.K.Nikiforov

Immunobiological Properties of *Francisella tularensis* Antigen Complexes

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Carried out are the studies of preparations of *Francisella tularensis* antigen complexes, obtained from the producer strains of different subspecies (*holarctica*, *nearctica*, *mediasiatica*, *novicida*). It is discovered that the outer-membrane (OM) antigen complex is a common antigen of *Francisella tularensis* regardless of its sub-specific origin. Antigen complexes isolated from strains of *holarctica*, *nearctica*, and *mediasiatica* subspecies have similar chemical and subunit composition, and immunobiological properties. Peculiarities of composition of *F. tularensis* subsp. *novicida* OM-antigen complex lead to the decrease of its immunogenicity and protective capability in comparison with analogous antigens of other subspecies.

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

Ареал возбудителя туляремии охватывает все страны умеренного климатического пояса Северного полушария, включая территорию России и соседних стран [4, 12]. И хотя в Российской Федерации заболеваемость туляремией находится на низком уровне, специалисты прогнозируют возможность обострения эпидемиологической обстановки по данной инфекции [3]. В связи с этим очевидна перспективность разработки новых и усовершенствование имеющихся иммунопрофилактических и диагностических препаратов. Особое внимание при этом уделяется изучению комплексных антигенов туляремиального микроба [10, 11, 12]. Одним из таких «природных коктейлей» является протективный антигенный комплекс (ПАК) туляремиального микроба, отличающийся повышенным содержанием белковых компонентов (до 65 % белка) и большей протективной активностью, по сравнению с ранее описанными комплексными антигенами [2, 6, 9]. Ранее были подробно изучены особенности его биосинтеза штаммом-продуцентом живой туляремиальной вакцины *F. tularensis* 15 НИИЭГ [7] и иммунобиологические свойства этого антигена [1].

В настоящей работе представлены данные сравнительного анализа иммунобиологических свойств препаратов ПАК, полученных из штаммов-продуцентов разных подвидов туляремиального микроба.

Материалы и методы

В работе использовали препараты ПАК, полученные из биомассы 48-часовых агаровых культур штаммов-продуцентов разных подвидов туляремиального микроба: ПАК-15 (из штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ), ПАК-503 (из штамма *F. tularensis* 503/840), ПАК-A`Cole (из штамма *F. tularensis* B399 A`Cole), ПАК-A 179 (из штамма *F. tularensis* A-179) и ПАК-Utah 112 (из штамма *F. tularensis* Utah 112). Препараты поверхностных антигенных комплексов *F. tularensis* получали по методике [7].

Уровень антител в сыворотке крови иммунизированных лабораторных животных оценивали в иммуноферментном анализе (ИФА, ДИА) с использованием коммерческой туляремиальной сыворотки и экспериментальных поликлональных антител к протективному антигенному комплексу (Ig «ПАК»). Анализ иммуногенности препаратов проводили на беспородных белых мышах (18–20 г) и морских свинках (250 г). В качестве положительного контроля использовали лабораторных животных, вакцинированных живой туляремиальной вакциной (ЖТВ), Омск. Постановку и учет реакции лейкоцитолитической осуществляли по стандартной методике [5]. Статистические профили распределения лейкоцитов белых мышей по

клеточному циклу – ДНК-гистограммы получали с использованием цитохимического метода V.Barlogie *et al.* [8] на импульсном проточном цитофлуориметре ICP-22 RHYWE. С помощью нитросинего тетразолиевого теста (НСТ) оценивали фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов белых мышей [1], выраженную в процентах фагоцитирующих клеток и фагоцитарным числом (количество захваченных частиц на один фагоцит).

Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента, доверительный интервал устанавливали при вероятности 95 %.

Результаты и обсуждение

По своим физико-химическим свойствам, биохимическому и иммунохимическому составу препараты ПАК из вирулентных штаммов туляремии микроба разных подвидов были аналогичны референс-препарату из вакцинного штамма. В частности, все препараты ПАК, кроме ПАК-Utah 112, по данным гель-хроматографии имели молекулярную массу около 280 кДа, обладали сходным химическим составом и содержали следующие иммунохимически активные субъединицы: 81–85, 57–60, 43, 23–27 и 14–17 кДа. Хроматографический профиль препарата ПАК-Utah 112 отличался наличием двух пиков с молекулярными массами около 280 и 160 кДа. Кроме того, в составе данного антигена были обнаружены дополнительные высокомолекулярные субъединицы более 110 кДа и отсутствовали полипептиды в области 57–85 кДа. Химический состав препарат ПАК-Utah 112 отличался от аналогичных препаратов других подвидов большим содержанием углеводного компонента.

При введении однократно подкожно препаратов ПАК белым мышам в дозе 10 мкг было отмечено, что во всех случаях к 3–7-м суткам регистрируются специфические антитела в ДИА в титре 1/40–1/120, с достижением максимума (до 1/260–1/320) к 14-м суткам (для ПАК-15, ПАК-503, ПАК-A`Cole и ПАК-A 179) и к 21-м суткам до 1/160 (для ПАК-Utah 112). Установлено, что оптимальными способами иммунизации ПАК являются парентеральные (подкожный, внутрибрюшинный) – титр в ДИА 1/320, тогда как при пероральном введении антителый ответ был зарегистрирован в более поздние сроки и в более низком титре (в 4–8 раз меньше). Увеличение кратности введения не оказывало влияния на уровень антител. У морских свинок (иммунизирующая доза 100 мкг препарата, однократно) антителый ответ к ПАК-15 был зарегистрирован только к 14-м суткам (титр в сэндвич-ИФА 1/320–1/640) после иммунизации, с максимумом к 42-м суткам (титр 1/640–1/960) и снижением уровня антител к 6 месяцам (титр 1/40–1/80) с начала эксперимента.

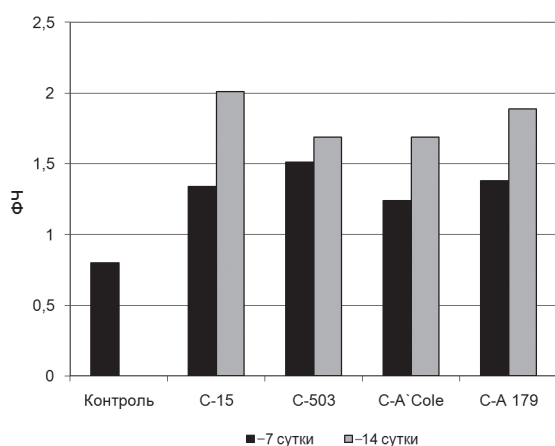
Проведен сравнительный анализ влияния иммунизации препаратами ПАК разных подвидов и ЖТВ на показатели клеточного звена иммунитета. При

оценке реакции лейкоцитолита у белых мышей, иммунизированных препаратами ПАК, полученными из вирулентных штаммов, отмечена волнообразная динамика показателей с максимумом на 14-е сутки иммуногенеза (33–36 %) и их снижение к окончанию срока наблюдения до отрицательного или слабоположительного уровня (15–20 %), соответствующего контрольной группе. После иммунизации белых мышей препаратами ПАК-15 реакция лейкоцитолита была резко положительна к 21-м суткам и составила в среднем 53,5 %. У мышей, вакцинированных ЖТВ, в эти же сроки коэффициент лейкоцитолита был равен 56 %. Положительный аллергический ответ у животных, иммунизированных препаратом ПАК-15, свидетельствует о его высокой иммуногенности.

В результате проведенных исследований влияния однократной иммунизации ПАК *F. tularensis* разных подвидов в дозе 10 мкг на показатели клеточного звена иммунитета белых мышей показано, что доля апоптотических тимоцитов и спленоцитов соответствовала контрольным значениям, что свидетельствует об отсутствии выраженного повреждающего действия всех 4 препаратов на клетки макроорганизма. Несмотря на некоторые отличия в действии ПАК разных подвидов на пролиферативную активность иммунокомпетентных клеток тимуса и селезенки белых мышей, к 14–21-м суткам они нивелировались. Причем уровень ответа спленоцитов на введение всех препаратов ПАК был выше, чем у тимоцитов (33,5±0,9 и 29,8±1,8 соответственно), а на 1-е сутки достоверно превышал этот показатель для ЖТВ (27,9±0,6). Кроме того, максимальной иммуногенностью обладал препарат ПАК-15, к 21-м суткам доля пролиферирующих клеток селезенки мышей была сопоставима с таковой при вакцинации животных (25,0±1,8 и 27,4±0,9 соответственно). Уровень пролиферативной активности тимоцитов во все сроки иммуногенеза при введении как препаратов ПАК, так и ЖТВ, был на уровне контрольных значений, что, вероятно, связано с более поздней активацией Т-лимфоцитов по сравнению с В-клетками и, учитывая положительный аллергический тест, с интенсивными процессами миграции иммунокомпетентных клеток.

Изменение фагоцитарных показателей указывает на степень вовлечения иммунокомпетентных клеток в процессы иммунобиологической перестройки вакцинированных против туляремии животных. Показано, что НСТ-редуцирующая активность макрофагов, степень которой выражена фагоцитарным числом (ФЧ), повышается после иммунизации каждым из 4 препаратов ПАК (рисунок). К 14-м суткам иммуногенеза наиболее высокая фагоцитарная активность макрофагов отмечалась у мышей, иммунизированных препаратом ПАК-15.

Изучение протективных свойств препаратов ПАК проводили на модели белых мышей, которых иммунизировали однократно подкожно возрастающими дозами от 5 до 625 мкг, с последующим зара-



Фагоцитарная активность макрофагов белых мышей в НСТ-тесте

жением вирулентными штаммами разных подвидов на 21-е сутки в дозе 100 м.к. Протективные свойства препарата ПАК-Utah 112 оценивали только против штамма голарктического подвида. Во всех экспериментах патолого-анатомическая картина и высевы из органов павших животных на селективные питательные среды указывали на гибель от туляремийной инфекции.

Установлено, что все полученные препараты ПАК, независимо от подвидовой принадлежности штамма-продуцента, защищают лабораторных животных от гибели при экспериментальной инфекции, вызванной вирулентными штаммами голарктического и неарктического подвида (таблица). Для препарата ПАК-A' Cole характерна более низкая иммуногенность против инфекции, вызванной гомологичным штаммом, чем гетерологичным, что согласуется с литературными данными [1]. При экспериментальной туляремии, вызванной штаммом среднеазиатского подвида (заражающая доза 100 LD₅₀), отмечена 100 % выживаемость всех иммунизированных животных (ED₅₀ препаратов 2,24 (1,8÷8,3) мкг) до 21-х суток (срок наблюдения) при 100 % гибели контрольной группы с продолжитель-

ностью жизни (5,6±0,4) сут. Это может быть связано с более низкой вирулентностью штамма (LD₅₀ 5 м.к.). Иммуногенность препарата ПАК-Utah 112 была ниже по сравнению с другими исследованными препаратами ПАК: выживаемость животных составила в среднем 37,5 %, средняя иммунизирующая доза препарата – 125,9 (66,7÷269,4) мкг. Возможно, отмеченные отличия в протективных свойствах связаны с биохимическими и иммунохимическими особенностями ПАК из подвида *novicida*.

Напряженность иммунитета определяли для препарата ПАК-15 на модели белых мышей (иммунизирующая доза 100 мкг) против вирулентных штаммов *F. tularensis* 503/840 и B399 A' Cole (заражали возрастающими дозами вирулентных штаммов от 1 до 1000 м.к.). Отмечена значительно более низкая напряженность иммунитета при заражении вирулентным штаммом неарктического подвида (индекс иммунитета равен 10) по сравнению с инфекцией, вызванной вирулентным штаммом голарктического подвида (индекс иммунитета составил 1468). Эти данные согласуются с результатами эксперимента по определению иммуногенности препарата ПАК-15 (таблица).

Таким образом, в процессе исследования иммунобиологических свойств препаратов ПАК туляремийного микроба разных подвида впервое было установлено, что, независимо от подвидовой принадлежности и вирулентности штамма-продуцента, ПАК имеет сходство по иммунобиологическим свойствам: обладает иммуногенностью, выраженной протективной активностью для лабораторных животных и не оказывает повреждающего действия на иммунокомпетентные клетки. Препарат ПАК из *F. tularensis* subsp. *novicida* обладает сниженной иммуногенностью и протективностью по сравнению с препаратами ПАК, полученными из штаммов-продуцентов других подвида. По результатам проведенных иммунологических тестов максимальной иммуномодулирующей активностью обладает ПАК из вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Иммуногенность препаратов ПАК для белых мышей при экспериментальной туляремийной инфекции

Заражающий штамм	Препарат	n/N	Δt, сут	ED ₅₀ , мкг (ED _{50 min} ÷ ED _{50 max})
<i>F. tularensis</i> 503/840 (LD ₅₀ =1 м.к.)	ПАК-15	22/23	20,4±0,9	3,1 (2,4÷11,3)
	ПАК-503	12/24	14,1±3,3	112,2 (48,9÷257)
	ПАК-A' Cole	11/24	13,4±2,7	131,8 (50,1÷407,4)
	ПАК-A 179	14/24	15,3±2,5	33,11 (27,2÷108)
	ПАК-Utah 112	9/24	13,2±3,9	125,9 (66,7÷269,4)
	Контроль	0/6	5,3±0,8	–
<i>F. tularensis</i> B399 A' Cole (LD ₅₀ =1 м.к.)	ПАК-15	10/24	13,2±2,4	95,5 (55,9÷169)
	ПАК-503	13/23	15,5±2,8	66,1 (25,1÷204)
	ПАК-A' Cole	5/23	10,9±1,8	562,3 (251,2÷818)
	ПАК-A 179	16/23	16,45±2,3	16,21 (9,2÷25,1)
	Контроль	0/6	5,8±0,6	–

Примечание. Δt – средняя продолжительность жизни с интервалом вероятности (M±mt), n/N – отношение выживших к общему числу мышей в группе, ED₅₀ – средняя иммунизирующая доза, диапазон min÷max.

Работа выполнена по государственному контракту № 52-Д/1 от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волох О.А., Шепелёв И.А., Фирстова В.В., Храмова Е.М., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И. и др. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса туляремияльного микроба, как перспективного компонента химических вакцин. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 3:16–21.
2. Жемчугов В.Е., Дятлов И.А., Кутырев В.В., Волох О.А. Способ получения препарата для активной иммунизации против туляремии. Патент РФ № 2221591, опубл. 20.01.2004. Бюл. № 2.
3. Кологоров А.И., Дмитриева Л.Н., Шиянова А.Е., Тарасов М.А., Поршаков А.М., Попов Н.В. и др. Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым и зоонозным инфекциям в Приволжском федеральном округе в 2000–2009 гг. и прогноз на 2010 г. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):5–10.
4. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 190 с.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. С. 27–61.
6. Хлебников В.С., Головлев И.Р., Кулеватский Д.П. и др. Изучение биохимических, антигенных и протективных свойств внешней мембраны возбудителя туляремии. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1991; 7:15–20.
7. Шепелёв И.А., Волох О.А., Еремин С. А., Дятлов И.А. Оптимизация способа получения С-комплекса туляремияльного микроба. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):61–4.
8. Barlogie B., Spitzer G., Hart G.S., Johnston D.A., Buchner T. et al. DNA histogram analysis of human hemopoietic cells. Blood. 1976; 2(48):245–58.
9. Golovliov I., Ericsson M., Sandström G. et al. Identification of proteins of *F. tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kDa protein. Infect. Immun. 1997; 6(65):2183–89.
10. Huntley J.F., Conley P.G., Hagman K.E., Norgard M.V. Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins.

J. Bacteriol. 2007; 2(189):561–74.

11. Spletstoeser W.D., Tomaso H., Dahouk S.A., Neubauer H., Schuff-Werner P.S. Diagnostic procedures in tularemia with special focus on molecular and immunological techniques. J. Vet. Med. 2005; 52:249–61.
12. Tärnvik A., Berglund L. Tularemia. Eur. Respir. J. 2003; 21(2):361–73.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Volokh O.A., Shepelev I.A., Firstova V.V., Khramkova E.M., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I. et al. [Evaluation of immunobiological activity of *Francisella tularensis* “C”-complex preparations as promising component of subunit vaccines]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 3:16–21.
2. Zhemchugov V.E., Dyatlov I.A., Kutyrev V.V., Volokh O.A. [Method of preparation obtainment for active immunization against tularemia]. RF Patent 2221591. 20 Jan 2004.
3. Kologorov A.I., Dmitrieva L.N., Shiyanova A.E., Tarasov M.A., Porshakov A.M., Popov N.V. et al. [Epidemiological situation on natural-focal and zoonotic infections in Privolzhsky Federal District in 2000–2009 and the prognosis for 2010]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 2(104):5–10.
4. Olsuf'ev N.G. [Taxonomy, Microbiology and Laboratory Diagnostics of Tularemia Agent]. Moscow: Meditsina; 1975. 190 p.
5. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Guidelines]. Moscow: Meditsina; 2009. P. 27–61.
6. Khlebnikov V.S., Golovlev I.R., Kulevatsky D.P. et al. [Studies of biochemical, antigen and protective properties of tularemia agent outer-membrane]. Mol. Gen. Microbiol. Virusol. 1991; 7:15–20.
7. Shepelev I.A., Volokh O.A., Eremine S.A., Dyatlov I.A. [Optimization of the techniques for deriving the protective “C”-complex of the tularemia pathogen]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; 2(92):61–4.

Authors:

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. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Кузнецова Е.М., Волох О.А., Смолькова Е.А., Щуковская Т.Н., Шепелёв И.А., Авдеева Н.Г., Кравцов А.Л., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 15.10.10.