

П.Ю.Попова, Н.И.Микшис, О.М.Кудрявцева, А.Ю.Гончарова, Л.В.Новикова, Т.Н.Каштанова,  
Ю.А.Попов, Е.А.Смолькова, А.Л.Кравцов, Т.Н.Щуковская

## ВЛИЯНИЕ ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА, СИНТЕЗИРУЕМОГО АСПОРОГЕННЫМ РЕКОМБИНАНТНЫМ ШТАММОМ *BACILLUS ANTHRACIS*, НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

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

На модели мышей линии BALB/c и морских свинок проведена оценка иммуногенности и безопасности препарата протективного антигена, полученного из аспорогенного рекомбинантного продуцента *B. anthracis* 55ΔТРА-1(Spo<sup>-</sup>). Показано, что развитие адаптивного иммунитета у иммунизированных очищенным белком лабораторных животных характеризуется высокими значениями титров специфических антител. Двукратная иммунизация био-моделей антигенным препаратом обеспечивает защиту от заражения тест-штаммом *B. anthracis*, сопоставимую с протективностью живой сибирезвеной вакцины. Получены данные, свидетельствующие о возможности уменьшения вводимой дозы вакцинного штамма при последующей однократной иммунизации протективным антигеном. Установлено, что в иммунизирующей дозе рекомбинантный протективный антиген не обладает реактогенностью и не оказывает повреждающего действия на тимоциты и спленоциты лабораторных животных.

*Ключевые слова:* сибирская язва, протективный антиген, иммунитет, антитела.

P.Yu.Popova, N.I.Mikshis, O.M.Kudryavtseva, A.Yu.Goncharova, L.V.Novikova, T.N.Kashtanova, Yu.A.Popov,  
E.A.Smol'kova, A.L.Kravtsov, T.N.Shchukovskaya

## Influence of the Protective Antigen, Produced by *Bacillus anthracis* Asporogenic Recombinant Strain, on the Immune System of Laboratory Animals

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Assessment of immunogenicity and biological safety of protective antigen preparation obtained from asporogenic recombinant producer, *B. anthracis* 55ΔТРА-1(Spo<sup>-</sup>), is made on the mice (BALB/c species) and Guiney pigs models. It is shown that the development of adaptive immunity in the inoculated with purified protein laboratory animals is characterized by high titers of specific antibodies. Double immunization of biological models with antigen preparation confers protection from *B. anthracis* infection, commensurable with protective capacity of the live anthrax vaccine. Obtained are the data confirming the possibility to reduce the injected doze of the vaccine strain in case of subsequent single immunization with protective antigen. It is determined that recombinant protective antigen shows no sign of reactogenicity and does not damage thymocytes and splenocytes in laboratory animals when administered for immunization.

*Key words:* anthrax, protective antigen, immunity, antibodies.

Особо опасная зооантропонозная инфекция – сибирская язва, вызываемая *Bacillus anthracis*, характеризуется острым началом и тяжелым течением. При несвоевременной диагностике и отсутствии этиотропной терапии летальность при сибирезвеной инфекции может достигать 90 % [4]. Ключевой момент патогенеза заболевания – воздействие экзотоксина возбудителя на инфицированный макроорганизм [6, 7]. Токсин *B. anthracis* состоит из трех компонентов – отежного фактора, летального фактора и протективного антигена (ПА). ПА, с одной стороны, участвует в образовании токсичных комплексов, а с другой – является основным иммуногеном возбудителя сибирской язвы.

Важным профилактическим мероприятием, осуществляемым на территориях стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации, является вакцинация населения и восприимчивых животных с использованием живых аттенуированных вакцин. Выраженное защитное действие живых вакцин сочетается с относительно высокой частотой развития побочных эффектов [1].

Избежать нежелательных последствий можно, используя для вакцинации очищенный препарат иммуногенного антигена возбудителя. Оптимальным источником ПА могут служить штаммы *B. anthracis*, лишенные детерминант синтеза основных факторов патогенности [5]. Использование в качестве продуцентов ПА сибирезвеной штаммов, не образующих спор, позволяет избежать микробной контаминации лабораторных и производственных помещений. В ходе предыдущих работ в лаборатории прикладной генетики РосНИПЧИ «Микроб» был сконструирован аспорогенный рекомбинантный штамм *B. anthracis*, содержащий гибридную плазмиду с клонированным геном *pag*, кодирующим синтез ПА. Из культурального фильтрата штамма-продуцента *B. anthracis* 55ΔТРА-1(Spo<sup>-</sup>) выделен ПА, достигнута высокая степень очистки препарата (90 %) за счет использования двухэтапной хроматографии [3].

Целью настоящей работы явилась оценка иммуногенности и безопасности препарата очищенного ПА на различных экспериментальных моделях.

## Материалы и методы

**Штаммы, лабораторные животные.** В работе использовали рекомбинантный штамм *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>) (КМ97, патент РФ № 2321629); вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1; тест-заражающий штамм *B. anthracis* 2-я вакцина Ценковского (ГИСК им. Л.А.Тарасевича, Москва).

Исследования проводили на морских свинках массой от 250 до 300 г и линейных мышах BALB/c – от 18 до 20 г.

**Приготовление спор штаммов сибиреязвенного микроба.** Культуру иммунизирующего или тест-заражающего штаммов *B. anthracis* выращивали в течение 3–5 сут на агаре Хоттингера при температуре 37 °С. Биомассу смывали с поверхности агара и дважды отмывали дистиллированной водой. Перед иммунизацией или заражением споры прогревали при температуре 65 °С в течение 30 мин.

**Выделение и очистка ПА из рекомбинантного штамма.** ПА выделяли из штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>). Антиген очищали двухэтапной хроматографией как описано ранее [3].

**Иммунизация лабораторных животных.** Очищенный ПА в сочетании с полным адьювантом Фрейнда (в объемном соотношении 2:1) вводили лабораторным животным подкожно двукратно с интервалом 14 дней. Иммунизирующая доза для морских свинок составила 25 мкг, для мышей BALB/c – 10 мкг. Инъекцию споровой взвеси вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 осуществляли подкожно однократно в дозах  $5 \cdot 10^6$  или  $5 \cdot 10^7$  КОЕ для морских свинок и  $2 \cdot 10^6$  КОЕ для линейных мышей. Контрольным животным вводили 0,9 % раствор натрия хлорида.

**Определение иммуногенности антигенного препарата и вакцинного штамма *B. anthracis*.** Через 21 день от последней иммунизации биомоделей заражали возрастающими дозами тест-штамма *B. anthracis* 2-ая вакцина Ценковского. Для иммунизированных морских свинок концентрация спор тест-заражающего штамма составила от  $1 \cdot 10^4$  до  $1 \cdot 10^7$  КОЕ, а для интактных – от  $1 \cdot 10^1$  до  $1 \cdot 10^4$  КОЕ. Иммунизированным линейным мышам вводили спорую взвесь в дозах от  $1 \cdot 10^3$  до  $1 \cdot 10^6$  КОЕ, контрольным животным – от  $1 \cdot 10^2$  до  $1 \cdot 10^5$  КОЕ. Наблюдение за зараженными животными осуществляли в течение 10 дней. Значение ЛД<sub>50</sub> тест-заражающего штамма подсчитывали по формуле Кербера. Индексы иммунитета определяли как отношение ЛД<sub>50</sub> заражающей культуры для вакцинированных и интактных животных.

**Постановка твердофазного иммуноферментного анализа.** Очищенный ПА вносили в лунки 96-луночных планшетов («Медполимер», Санкт-Петербург) в концентрации 5–10 мкг/мл. Меченые пероксидазой видоспецифические антитела (НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, Москва) использовали в рабочем разведении 1:1000. В качестве

хромогенного субстрата использовали АВТС (Sigma, США). Результаты регистрировали спектрофотометрически с помощью Stat Fax (Awareness Technology, США) при длине волны 405 нм.

**Цитофлуориметрический мониторинг пролиферативной активности спленоцитов и тимоцитов.** Линейным мышам вводили ПА в дозе 10 мкг однократно подкожно. Лимфоциты тимуса и селезенки выделяли общепринятыми методами [2]. Окрашивание лимфоцитов проводили смесью бромиды этидия и митрамицина в течение 20 мин. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре ICP-22 PHUYWE (Германия).

## Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования определяли напряженность и длительность поствакцинального иммунитета. Лабораторных животных иммунизировали ПА, полученным из аспорогенного рекомбинантного продуцента. В качестве группы сравнения использовали биомоделей, иммунизированных вакцинным штаммом *B. anthracis* СТИ-1. Забор крови осуществляли из краевой ушной вены у морских свинок и из хвостовой вены у линейных мышей в различные сроки – на 7, 14, 21, 28-е сутки, а также через 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 и 4,5 месяца после начала иммунизации. Титр антител к ПА определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

Отмечены следующие особенности антителообразования у мышей линии BALB/c. После двукратной иммунизации дозой 10 мкг очищенного препарата ПА происходило постепенное нарастание титров специфических антител. К 21-му дню иммуногенеза титр анти-ПА антител составил 1/2560, а через 2 месяца он достигал максимального значения – 1/40000 (рис. 1). Вслед за пиком отмечали снижение титров до уровня 1/20000 – через 2,5 месяца, 1/5120 – через 3–3,5 месяца, и 1/640 – через 4,5 месяца. В сыворотках животных, вакцинированных *B. anthracis* СТИ-1,

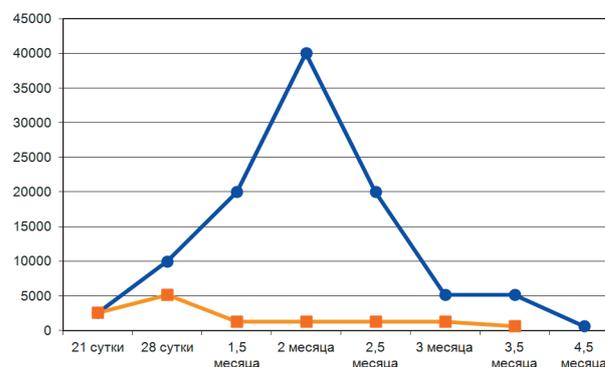


Рис. 1. Динамика титров анти-ПА антител при иммунизации линейных мышей BALB/c препаратом ПА (линия синего цвета) или вакцинным штаммом (линия оранжевого цвета):

По оси абсцисс – сутки и месяцы после иммунизации. По оси ординат – обратные значения титров сывороточных анти-ПА антител. На графиках приведены средние значения данных, полученных от 5 особей животных

максимум анти-ПА антител выявлялся на 28-е сутки –  $1/5120$ . В дальнейшем выявляли титры на уровне  $1/1280$  – через 1,5–3 месяца, и  $1/640$  – через 3,5 месяца. На протяжении всего срока наблюдения титры антител к ПА у мышей, иммунизированных антигенным препаратом, были выше.

После двукратной иммунизации морских свинок дозой 25 мкг рекомбинантного ПА отмечали повышение титров анти-ПА антител – до  $1/1280$  к 21-м суткам,  $1/5120$  – к 2 месяцам (рис. 2). Пик антителогенеза ( $1/40000$ ) регистрировали через 2,5 месяца от начала эксперимента. В случае иммунизации споровой взвесью штамма *B. anthracis* СТИ-1 ( $5 \cdot 10^6$  КОЕ) максимальный титр антител к ПА в сыворотках животных отмечали через 1,5 месяца –  $1/2560$ . В целом во все сроки количество антител к ПА у биомоделей, иммунизированных антигенным препаратом, было примерно в 2–4 раза больше.

Параллельно в течение первых двух недель проводили оценку реактогенности вводимого экспериментальным моделям препарата ПА. Каждые два дня определяли массу тела морских свинок и линейных мышей, осматривали и пальпировали место инъекции. За время наблюдения не отмечалось снижения веса лабораторных животных. Визуальных и пальпаторных изменений на месте введения препарата не регистрировали.

На следующем этапе оценивали способность ПА защищать лабораторных животных от заражения различными дозами тест-штамма *B. anthracis* 2-я вакцина Ценковского. В экспериментах были использованы морские свинки и мыши линии BALB/c по 20 особей в каждой. Опытных биомоделей иммунизировали ПА или вакцинным штаммом *B. anthracis* СТИ-1. Животных контрольной группы оставляли интактными. Заражение осуществляли через 21 день от последней иммунизации. По истечении периода наблюдения, через 10 сут, подсчитывали значения  $LD_{50}$  тест-заражающего штамма и индексов иммунитета.

Необходимо отметить, что в течение поствакци-

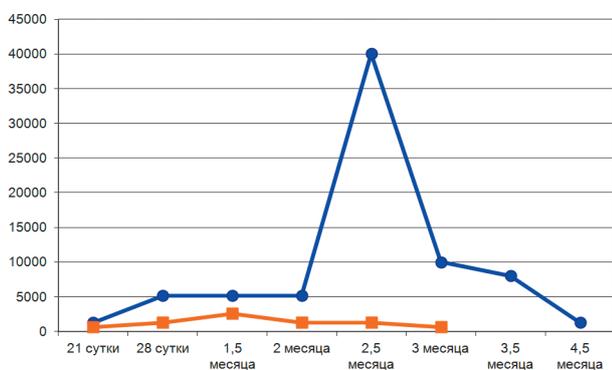


Рис. 2. Динамика титров анти-ПА антител при иммунизации морских свинок препаратом ПА (линия синего цвета) или вакцинным штаммом (линия оранжевого цвета):

По оси абсцисс – сутки и месяцы после иммунизации. По оси ординат – обратные значения титров сывороточных анти-ПА антител. На графиках приведены средние значения данных, полученных от 3 особей животных

нального периода среди морских свинок, иммунизированных вакцинным штаммом, пало около 25 % особей, тогда как в других группах подобных случаев зафиксировано не было.

В исследовании на модели линейных мышей были получены следующие результаты. В группе интактных животных показатель  $LD_{50}$  составил  $5 \cdot 10^2$  спор штамма *B. anthracis* 2-я вакцина Ценковского. Для биомоделей, иммунизированных ПА, значение  $LD_{50}$  было на два порядка выше –  $7,9 \cdot 10^4$  спор. Степени защиты при иммунизации препаратом ПА в дозе 10 мкг и вакцинным штаммом *B. anthracis* СТИ-1 в дозе  $2 \cdot 10^6$  КОЕ были сопоставимы. В последнем случае показатель  $LD_{50}$  составил  $3,1 \cdot 10^4$  спор. Соответственно индексы иммунитета оказались практически одного порядка: для препарата ПА – 158,5, для *B. anthracis* СТИ-1 – 63,2.

В экспериментах на морских свинках наблюдали аналогичную тенденцию. Препарат ПА, полученный из аспорогенного рекомбинантного штамма, в дозе 25 мкг обладал протективностью на уровне вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1. Показатель  $LD_{50}$  тест-заражающего штамма для иммунизированных антигенным препаратом свинок составил  $1,9 \cdot 10^7$  спор, в то время как для интактных животных он был ниже на четыре порядка –  $5 \cdot 10^3$  спор. Значение  $LD_{50}$  тест-штамма для биомоделей, вакцинированных *B. anthracis* СТИ-1 в дозе  $5 \cdot 10^7$  КОЕ, оказалось  $2 \cdot 10^7$  спор, а в дозе  $5 \cdot 10^6$  КОЕ –  $3,1 \cdot 10^6$  спор. Следовательно, индексы иммунитета у животных, получивших препарат ПА и вакцинный штамм (в дозе  $5 \cdot 10^7$  КОЕ), были почти одинаковыми – 3980 и 3990.

На модели морских свинок тестировали также комбинированную схему иммунизации. Лабораторным животным сначала вводили дозу  $5 \cdot 10^6$  КОЕ штамма *B. anthracis* СТИ-1, а затем в конце поствакцинального периода (через 21 день) – 25 мкг очищенного рекомбинантного ПА в сочетании с адьювантом. В этом случае значение  $LD_{50}$  регистрировали на уровне  $1,7 \cdot 10^7$  спор, индекс иммунитета составил 3548. Полученные результаты свидетельствуют о возможности уменьшения вводимой дозы вакцинного штамма при дополнительной однократной иммунизации препаратом рекомбинантного антигена.

Для оценки влияния препарата ПА на иммунную систему биомоделей проводили исследование пролиферативной активности лимфоцитов органов центрального и периферического иммуногенеза. В качестве биомодели были выбраны линейные мыши BALB/c. Лабораторных животных (по 6 особей на каждый срок) иммунизировали подкожно препаратом ПА. Контролем служили интактные животные. Пробы тимуса и селезенки забирали через 4 ч, на 1, 3, 7 и 14-е сутки после иммунизации. Процентное соотношение тимоцитов и спленоцитов в фазах клеточного деления регистрировали с помощью проточного цитофлуориметра. В каждом образце анализировалось не менее 30000 клеток. Апоптоз оценивали по накоплению гиподиплоидных клеток в пике, рас-

Распределение тимоцитов и спленоцитов линейных мышей BALB/c, иммунизированных рекомбинантным протективным антигеном, по клеточному циклу

Иммунизирующий препарат	Срок иммуногенеза	Пролиферирующие клетки, %	Апоптотические клетки, %	Баланс
<i>Тимус</i>				
Контроль		28,7±1,5	3,6±0,3	0,12
ПА 10 мкг	4 ч	32,4±0,8	3,2±0,3	0,10
	1 сут	32,8±0,9	2,8±0,2	0,09
	3 сут	30,1±1,3	2,3±0,5	0,08
	7 сут	30,9±2,7	3,1±0,5	0,10
	14 сут	26,6±0,7	2,8±0,2	0,10
<i>Селезенка</i>				
Контроль		27,7±1,6	2,8±0,3	0,10
ПА 10 мкг	4 ч	25,5±2,5	4,5±0,8	0,18
	1 сут	24,2±0,8	4,4±1,2	0,18
	3 сут	22,7±1,9	5,8±1,4	0,25
	7 сут	33,7±1,6	5,2±1,3	0,15
	14 сут	33,7±2,4	2,4±0,4	0,07

полагающемся левее пика, соответствующего диплоидным клеткам. Активацию иммунокомпетентных клеток отражало их число в стадии пролиферации. Определяли также соотношение клеток, находящихся в стадии апоптоза и пролиферации. Значение данного индекса меньше единицы свидетельствует об отсутствии повреждающего действия исследуемого препарата на иммунокомпетентные клетки.

При иммунизации линейных мышей очищенным препаратом ПА во все сроки исследования апоптотическая и пролиферативная активность клеток тимуса существенно не отличалась от аналогичных показателей в группе контроля (таблица). Баланс апоптоза и пролиферации не превышал 1,0. В пробах селезенки, взятых через 4 ч, на 1-е и 3-и сутки, число пролиферирующих спленоцитов соответствовало контрольным значениям. На 7 и 14-е сутки регистрировали повышение пролиферативной активности клеток селезенки, что может быть обусловлено пролиферацией В-клеток и антителопродукцией. Введение мышам ПА не влияло на апоптотическую активность спленоцитов. Индекс соотношения клеток селезенки в стадии апоптоза и пролиферации не превышал 1,0.

Таким образом, синтезируемый рекомбинантным аспорогенным штаммом антиген вызывает развитие у лабораторных животных напряженного адаптивного иммунитета, характеризующегося высокими значениями индексов иммунитета и титров специфических антител. Показано, что в иммунизирующей дозе препарат ПА не обладает реактогенностью и не оказывает повреждающего действия на иммунокомпетентные клетки органов центральной и периферической иммунной системы. Планируется расширение исследований по изучению взаимодействия рекомбинантного ПА с клетками врожденного и адаптивного иммунитета.

Работа выполнена по государственному контракту № 62-Д/2 от 23.08.2011 в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система хими-

ческой и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2012 годы)».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Турин Е.А., Степанов А.В. и др. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: ЗАО МП «Гигиена»; 2008. 416 с.
2. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. СПб.; 2000.
3. Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Шулепов Д.В., Гончарова А.Ю., Болотникова М.Ф., Новикова Л.В. и др. Аспорогенный рекомбинантный продуцент протективного антигена сибиреязвенного микроба. Биотехнология. 2010; 4:25–33.
4. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В., Харечко А.Т., Васильев П.Г., Садовой Н.В. и др. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики. М.: ВУНМЦ МЗ РФ; 1999. 447 с.
5. Baillie L. Is new always better than old? The development of human vaccines for anthrax. Hum. Vaccin. 2009; 5(12):806–16.
6. Koehler T. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. Mol. Aspects Med. 2009; 30:386–96.
7. Mock M., Fouet A. Anthrax. Microbiol. Rev. 2001; 55:647–71.

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

1. Marinin L.I., Onishchenko G.G., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Turin E.A., Stepanov A.V. et al. [Human Anthrax: Epidemiology, Prophylaxis, Diagnosis, Treatment]. M.: ZAO MP "Gigiena"; 2008. 416 p.
2. Medical Laboratory Technologies. Reference Book. St. Petersburg; 2000.
3. Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Shulepov D.V., Goncharova A.Yu., Bolotnikova M.F., Novikova L.V. et al. [Asporogenic recombinant producer of anthrax protective antigen]. Biotechnologia. 2010; 4:25–33.
4. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Litusov N.V., Kharechko A.T., Vasil'ev P.G., Sadovoy N.V. et al. [Anthrax: Relevant Issues of Microbiology, Epidemiology, Clinical Picture, Treatment and Prophylaxis]. M.: Ministry of Health of the Russian Federation; 1999. 447 p.

#### Authors:

Popova P.Yu., Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Goncharova A.Yu., Novikova L.V., Kashtanova T.N., Popov Yu.A., Smol'kova E.A., Kravtsov A.L., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Попова П.Ю., Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Гончарова А.Ю., Новикова Л.В., Каштанова Т.Н., Попов Ю.А., Смолькова Е.А., Кравцов А.Л., Щуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 06.09.11.