

П.Ю.Попова, Н.И.Микшис, А.Ю.Гончарова,
Т.Н.Каштанова, Ю.А.Попов

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОМ СИБИРЕЯЗВЕННОГО ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА, РЕКОМБИНАНТНЫМ ИЛИ ВАКЦИННЫМ ШТАММАМИ *BACILLUS ANTHRACIS*

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

Протективный антиген, полученный из аспорогенного рекомбинантного штамма *Bacillus anthracis*, в экспериментах *in vivo* вызывает развитие напряженного адаптивного иммунитета. Двукратная иммунизация кроликов дозой 50 мкг очищенного белкового препарата стимулирует выработку специфических антител в более высоких титрах, чем в случае иммунизации вакцинным или генно-инженерным сибиреязвенным штаммами. Выявлено, что рекомбинантный штамм *B. anthracis* дополнительно инициирует выработку антител к белку S-слоя возбудителя сибирской язвы.

Ключевые слова: сибирская язва, протективный антиген, вакцины, иммунитет, антителогенез.

P.Yu.Popova, N.I.Mikshis, A.Yu.Goncharova, T.N.Kashtanova, Yu.A.Popov

Peculiarities of Antibody Genesis in the Laboratory Animals Immunized with Anthrax Protective Antigen Preparation, *Bacillus anthracis* Recombinant or *Bacillus anthracis* Vaccine Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Protective antigen, extracted from *Bacillus anthracis* asporogenic recombinant strain, triggers progression of a high-grade adaptive immunity *in vivo*. Two-fold immunization of rabbits with the purified protein preparation in a dose of 50 mcg induces production of specific antibodies in titers higher than those registered in case of immunization with vaccine or genetically engineered anthrax strains. It is determined that the recombinant *B. anthracis* strain initiates further production of antibodies towards S-layer protein of anthrax agent.

Key words: anthrax, protective antigen, vaccines, immunity, antibody genesis.

Противоэпидемические мероприятия в неблагополучных по сибирской язве очагах включают вакцинацию контингента групп риска и сельскохозяйственных животных. Используемая на территории России лицензированная живая аттенуированная вакцина *Bacillus anthracis* СТИ-1 обеспечивает формирование напряженного иммунитета. Однако ее недостатком является относительно высокая частота возникновения побочных эффектов, обусловленных действием токсичных продуктов [1]. Снижение риска возникновения нежелательных последствий возможно за счет использования для вакцинации очищенного препарата протективного антигена (ПА) – основного иммуногена возбудителя сибирской язвы [5].

В РосНИПЧИ «Микроб» на основе бессплазмидных производных вакцинных штаммов *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 55 были сконструированы рекомбинантные штаммы, лишенные детерминант синтеза основных факторов патогенности сибиреязвенного микроба, но содержащие ген *rag*, кодирующий синтез ПА [2, 3].

Цель данного исследования – сравнение динамики титров антител у кроликов, иммунизированных препаратом протективного антигена, полученного из генно-инженерного продуцента, вакцинным или рекомбинантным штаммами *B. anthracis*.

Материалы и методы

В работе использовали: рекомбинантный штамм *B. anthracis* СТИДПА-1 (КМ 96, патент РФ № 2321628) (Государственная коллекция патогенных бактерий, Саратов), вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 (ФГБУ «НЦЭСМП», Москва). Рекомбинантный и вакцинный штаммы *B. anthracis* выращивали на агаре Хоттингера (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов) при температуре 37 °С. В среду при необходимости добавляли канамицин (Merck, Германия) – 25 мкг/мл.

ПА выделяли из штамма *B. anthracis* 55ДТПА-1(Spo⁻). Антиген очищали двухэтапной хроматографией, как описано ранее [2]. Подготовку споровой взвеси штаммов *B. anthracis* осуществляли по стандартной методике [3]. Для иммунизации использовали кроликов породы шиншилла массой от 2,5 до 3 кг (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов). Титры антител к протеинам ПА и ЕА1 в сыворотках иммунизированных животных определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа [3].

Результаты и обсуждение

ПА получали из аспорогенного рекомбинантного продуцента *B. anthracis* 55ДТПА-1(Spo⁻) [3].

Очищенный белковый препарат вводили кроликам в дозе 50 мкг в сочетании с полным адьювантом Фрейнда. Инъекции делали подкожно двукратно с интервалом в 2 недели. Для сравнения использовали группы животных (по три особи в каждой), иммунизированных подкожно двукратно дозой $5 \cdot 10^7$ спор вакцинного (*B. anthracis* СТИ-1) или рекомбинантного (*B. anthracis* СТИДТПА-1) штаммов. Повторные иммунизации культурами штаммов *B. anthracis* проводили на 21-е сутки. Кроликов контрольной группы оставляли интактными. Забор крови из краевой ушной вены биомоделей осуществляли на 7, 14, 21, 28, 35-е сутки, а также через 1,5; 2 и 2,5 мес. после первой иммунизации. Титры антител к ПА в сыворотках лабораторных животных определяли с помощью твердофазного иммуоферментного анализа.

При иммунизации кроликов препаратом очищенного ПА титры специфических антител достигали наиболее высоких значений, оставаясь на существенном уровне до конца срока наблюдения (рис. 1). Повторная иммунизация стимулировала дополнительное антителообразование в организме лабораторных животных. Нарастание титров специфических антител у кроликов, иммунизированных препаратом ПА, продолжалось в течение 1,5 мес. Максимальные значения (1/8000–1/128000) регистрировали через 45 сут после первой иммунизации или 30 сут после второй. В дальнейшем в сыворотках биомоделей происходило постепенное снижение количества антител к ПА до титров: 1/2000–1/64000 – к 2 мес. и 1/1000–1/16000 – через 2,5 мес. от начала эксперимента.

Динамика титров антител к ПА при использовании вакцинного или рекомбинантного штаммов *B. anthracis* отличалась большей сглаженностью показателей (рис. 1). Схожесть основных тенденций образования антител в случаях иммунизации споровыми аттенуированными культурами не ис-

ключала существования некоторых особенностей. Антителообразование у лабораторных животных, иммунизированных *B. anthracis* СТИ-1, характеризовалось более высокими значениями титров анти-ПА антител в первый месяц поствакцинального периода. Пик антителообразования у биомоделей, вакцинированных *B. anthracis* СТИ-1, приходился на 35-е сутки от начала эксперимента, а у кроликов, иммунизированных рекомбинантным штаммом *B. anthracis* СТИДТПА-1, на 45-е сутки. Максимальные значения титров антител у кроликов в эти периоды находились в пределах от 1/4000 до 1/32000. В дальнейшем в обоих случаях происходило постепенное снижение количества антител. Однако у кроликов, получивших ту же дозу рекомбинантного штамма, данный процесс отличался меньшей интенсивностью. Через 2 и 2,5 мес. от начала эксперимента титры антител были на достаточно высоком уровне – 1/1000–1/16000 и 1/512–1/16000. У биомоделей, иммунизированных вакцинным штаммом, эти же значения составили 1/1000–1/8000 и 1/128–1/4000.

Как известно, иммунный ответ на введение живой сибиреязвенной вакцины характеризуется поливалентной детерминацией. Помимо доминирующего ПА, в его формировании принимают участие и другие составляющие сибиреязвенного токсина, а также различные поверхностные структуры, включая споровые антигены и белки S-слоя [4, 6]. В этой связи в сыворотках кроликов, иммунизированных вакцинным или рекомбинантным штаммами, дополнительно определяли титры антител к белку EA1. Хотя S-слой возбудителя сибирской язвы представлен двумя протеинами Sap и EA1, в макроорганизме синтезируется преимущественно EA1, продукция белка Sap более характерна для роста штаммов *B. anthracis in vitro* [8].

Количество анти-EA1 антител у кроликов, иммунизированных штаммами *B. anthracis* СТИ-1 и

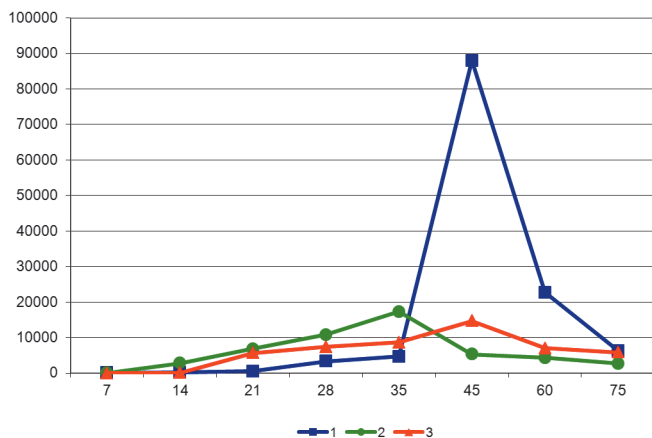


Рис. 1. Динамика титров анти-ПА антител при иммунизации лабораторных животных (кроликов) препаратом ПА, вакцинным и рекомбинантным штаммами. По оси абсцисс – сутки после первой иммунизации. По оси ординат – обратные значения титров анти-ПА антител в сыворотках кроликов, иммунизированных двукратно:

1 – препаратом очищенного ПА; 2 – споровой взвесью штамма *B. anthracis* СТИ-1; 3 – споровой взвесью штамма *B. anthracis* СТИДТПА-1. На графиках приведены средние значения данных, полученных от 3 особей животных

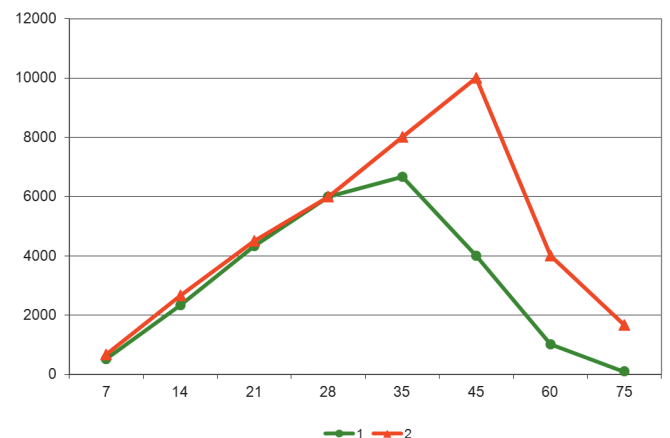


Рис. 2. Динамика титров анти-EA1 антител при иммунизации лабораторных животных (кроликов) вакцинным и рекомбинантным штаммами. По оси абсцисс – сутки после первой иммунизации. По оси ординат – обратные значения титров анти-EA1 антител в сыворотках кроликов, иммунизированных двукратно:

1 – споровой взвесью штамма *B. anthracis* СТИ-1; 2 – споровой взвесью штамма *B. anthracis* СТИДТПА-1. На графиках приведены средние значения данных, полученных от 3 особей животных

B. anthracis СТИДТПА-1, в первые полтора месяца эксперимента закономерно увеличивалось (рис. 2). Изменения титров в обеих группах животных происходили почти синхронно в течение 28 сут. В последующем тенденция изменилась и значения титров антител к ЕА1 были выше у лабораторных животных, получивших иммунизирующую дозу рекомбинантной культуры. Максимум антител к белку S-слоя отмечали в сыворотках, взятых на 35-е сутки после первичной иммунизации кроликов вакциной *B. anthracis* СТИ-1 (1/2000–1/16000) и на 45-е сутки после введения первой дозы рекомбинантного штамма (1/4000–1/16000). Аналогичная закономерность распределения пиков антителообразования во времени была установлена и в исследовании влияния ПА на формирование иммунного ответа макроорганизма. Спустя 2 и 2,5 мес. значения титров анти-ЕА1 антител были значительно выше у биомоделей, иммунизированных споровой взвесью *B. anthracis* СТИДТПА-1, – 1/2000–1/8000 и 1/1000–1/2000 соответственно. В то же время у кроликов, которым вводилась такая же доза вакцинного штамма, они составили 1/512–1/2000 и 1/32–1/128. На наш взгляд, более напряженная выработка антител к ЕА1 у животных, иммунизированных генно-инженерным штаммом, связана с его генетическими особенностями, а именно отсутствием гена *pagR*, осуществляющего негативную регуляцию синтеза не только ПА, но и белков S-слоя сибиреязвенного микроба [7].

Таким образом, продуцируемый рекомбинантным аспорогенным штаммом ПА приводит к развитию у лабораторных животных адаптивного иммунитета, характеризующегося высокими титрами специфических антител. После двукратной иммунизации кроликов препаратом очищенного ПА происходит «всплеск» выработки анти-ПА антител, достигающий максимума к 45-му дню иммуногенеза. В течение последующего за пиком периода количество антител к ПА в сыворотках биомоделей, иммунизированных антигенным препаратом, превышало значения, регистрируемые у животных, иммунизированных живой сибиреязвенной вакциной. Относительное выравнивание значений титров антител достигается через 2,5 мес.

Дополнительно выявлены некоторые особенности динамики титров антител к ПА и белку S-слоя при иммунизации штаммом *B. anthracis* СТИДТПА-1. В случае двукратного введения споровой взвеси рекомбинантного штамма максимальные количества антител к ПА и ЕА1 регистрировали на 45-е сутки от начала иммунизации, а при аналогичной схеме введения вакцинной культуры – на 35-е сутки. Кроме того,

у животных, иммунизированных генно-инженерным штаммом, после достижения максимума титры антител к ПА и ЕА1 снижались менее интенсивно. В совокупности полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения взаимодействия рекомбинантного ПА с клетками иммунной системы биомоделей с целью конструирования эффективных и менее реактогенных сибиреязвенных вакцин.

Работа выполнена по государственному контракту № 62-Д от 22.07.2011 г. в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Тюрин Е.А., Степанов А.В., Никифоров В.В. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: ЗАО МП «Гигиена»; 2008. 416 с.
2. Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Болотникова М.Ф., Шулепов Д.В., Новикова Л.В., Попов Ю.А. и др. Иммуногенность рекомбинантных бациллярных штаммов с клонированным геном синтеза протективного антигена *Bacillus anthracis*. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2007; 3:15–21.
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. Brossier F, Levy M, Mock M. Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. Infect. Immun. 2002; 70:661–4.
5. Chitlaru T, Altboum Z, Reuveny S, Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. Immunol. Rev. 2011; 239(1):221–36.
6. Gat O., Grosfeld H., Ariel N. Search for *Bacillus anthracis* potential vaccine candidates by a functional genomic-serologic screen. Infect. Immun. 2006; 74(7):3987–4001.
7. Mignot T., Mock M., Fouet A. A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis*. Mol. Microbiol. 2003; 47(4):917–27.
8. 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., Tyurin E.A., Stepanov A.V., Nikiforov V.V. [Anthrax in Humans: Epidemiology, Prophylaxis, Diagnostics, and Treatment]. M.: ZAO MP "Gigiena"; 2008. 416 p.
2. Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Bolotnikova M.F., Shulepov D.V., Novikova L.V., Popov Yu.A. et al. [Immunogenicity of the recombinant bacillary strains with the genetically engineered gene responsible for *Bacillus anthracis* protective antigen synthesis]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2007; 3:15–21.
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 agent protective antigen]. Biotekhnologiya 2010; 4:25–33.

Authors:

Popova P.Yu., Mikshis N.I., Goncharova A.Yu., Kashtanova T.N., Popov Yu.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Попова П.Ю., Микшис Н.И., Гончарова А.Ю., Каштанова Т.Н., Попов Ю.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 05.07.11.