

9. Gurjav U., Erkhembayar B., Burneebaatar B., Narmandakh E., Tumenbayar O., Hill-Cawthorne G.A. et al. Transmission of multi-drug resistant tuberculosis in Mongolia is driven by Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to all first-line drugs. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016; 12 (101): 49 – 53.
10. Zhdanova S.N., Ogarkov O.B., Vinokurova M.K., Alekseeva G.I., Kravchenko A.F., Savilov E.D. Modeling the distribution of major clones of the causative agent of tuberculosis in the Sakha (Yakutia). *Tuberkulez i bolezni legkih. [Tuberculosis and Lung Diseases]*. 2017; 95 (7): 40-47. (in Russian)
11. Mokrousov I. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015; T 6(95) :167-176.
12. Railway transport in Mongolia. Available at: <https://ru.wikipedia.org/wiki>. (in Russian).

Оценка степени аллергизирующего действия различных препаратов *Francisella tularensis*

Т.П. Старовойтова, В.И. Дубровина (dubrovina-valya@mail.ru), Т.А. Иванова, А.В. Корнева, С.А. Витязева, М.Ю. Котлов, С.В. Балахонов

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, (adm@chumin.irkutsk.ru)

Резюме

Проведена оценка степени сенсibilизации лейкоцитов крови морских свинок, иммунизированных препаратами клеточных стенок *Francisella tularensis* разных подвидов. Показано, что препараты КС *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* А-61 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* В-399 А-Сол, в отличие от препаратов КС *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306, не вызывают аллергизацию организма.

Ключевые слова: туляремия, лейкоциты, клеточные стенки, сенсibilизация

Assessment of the Degree of Allergic Effects of Various Drugs of *Francisella tularensis*

T.P. Starovoitova, V.I. Dubrovina (dubrovina-valya@mail.ru), T.A. Ivanova, A.V. Korneva, S.A. Vityazeva, M.Yu. Kotlov, S.V. Balakhonov *Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and the Far East of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance* (adm@chumin.irkutsk.ru)

Abstract

The evaluation of sensitization conducted on guinea pig leukocytes immunized with the cell wall preparations of *F. tularensis*. In this research was shown that the cell wall preparations *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* A-61 and *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole do not caused allergization in contrast with cell wall prepararions of *F. tularensis* 15 (extracted by Research Institute of Epidemiology and Hygiene) and *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306.

Key words: *Francisella tularensis*, tularemia, leukocytes, cell wall, sensitization

Введение

Применяемые в настоящее время вакцины обладают сенсibilизирующим действием и могут вызывать аллергические реакции. Формирование специфической гиперчувствительности рассматривается как нежелательный фактор, создающий предпосылки для осложнений аллергической природы при повторном введении препарата. Аллергическую сенсibilизацию можно рассматривать как частный случай усиленного либо недостаточно отрегулированного первичного иммунного ответа [1]. Сенсibilизированные клетки белой крови при контакте с антигенами подвергаются массовому разрушению – лейкоцитолиту, что приводит к выбросу в кровеносное русло биогенных аминов, токсинов, ферментов, являющихся медиаторами аллергических реакций немедленного типа. Не является исключением и лицензированная живая модифицированная вакцина Эльберт-Гайского

отечественного производства на основе штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, применяемая в настоящее время в эндемичных очагах туляремии на территории России [2]. Обладая высокой иммуногенностью при однократном введении, она успешно используется на протяжении длительного времени. Однако применение живой вакцины имеет определенное ограничение, вызванное высокой реактогенностью и отсутствием полных знаний о молекулярных механизмах формирования иммунитета к туляремии [3], что дает основание говорить об актуальности работы в области создания более эффективных профилактических препаратов. Современная стратегия иммунопрофилактики туляремии во многом определяется поиском средств, способных потенцировать иммунные реакции макроорганизма.

На специфичность иммунного ответа макроорганизма у возбудителя туляремии влияют

липополисахарид (ЛПС) и белки внешней мембраны (ВМ), которые рассматриваются как основа профилактических и диагностических препаратов [4, 5]. Во многих работах показано, что независимо от подвидовой принадлежности штаммов-продуцентов, полученные препараты обладают выраженной антигенной активностью, нетоксичны для животных и иммуногенны [5].

В связи с этим исследование препаратов клеточных стенок (КС) *F. tularensis* разных подвидов является актуальным.

Цель работы – оценить степень сенсibilизации лейкоцитов крови с помощью реакции лейкоцитоза у экспериментальных животных, иммунизированных клеточными стенками *F. tularensis* разных подвидов.

Материалы и методы

В работе использовали препараты клеточных стенок *F. tularensis* разных подвидов, полученные из трех вирулентных штаммов живых культур: *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* A-61 (ЛД₅₀ для белых мышей – 1 м.к.), *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole (ЛД₅₀ для белых мышей – 1 м.к.), *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306 (ЛД₅₀ для белых мышей – 1 м.к.) и вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ (ЛД₅₀ для белых мышей – 2 × 10⁶ м.к.) из музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института. Работу с экспериментальными животными осуществляли в соответствии с приложением к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708 н «Правила лабораторной практики». В опыте использовали 30 сертифицированных морских свинок обоих полов весом 250 – 300 г.

Работа выполнялась *in vitro* в два этапа. На первом этапе в стерильную пробирку, обработанную гепарином (50 Ед), набирали 3 мл крови из сердца интактных морских свинок. Затем гепаринизированную кровь разливали по 0,45 мл в стерильные пробирки. В первую, которая являлась контролем, добавили 0,05 мл 0,9% хлористого натрия. Во вторую, третью, четвертую и пятую опытные пробирки вносили 0,9% хлористого натрия по 0,025 мл и по 0,025 мл исследуемого препарата (95 мкг/мл – максимальная доза, не вызывающая спонтанного повреждения клеток крови): во вторую пробирку – КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ (далее по тексту *F. tularensis* 15 НИИЭГ), третью – КС *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* A-61, четвертую – КС *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole и в пятую – КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306. Пробирки инкубировали в течение 80 минут при температуре 37 °С, затем тщательно перемешивали и согласно общепринятой методике готовили разведения крови, количество лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева в 25 больших квадратах [6]. Эксперименты проводили в пяти повторах.

Оценку результатов производили по формуле:

$$K(\%) = (L_k - L_o) / L_k \times 100\%, \text{ где}$$

L_k – количество лейкоцитов в контрольной группе,
L_o – количество лейкоцитов в опытной группе,
K – коэффициент лейкоцитоза.

По степени интенсивности реакции результат оценивали: отрицательный или сомнительный – разрушение клеток меньше 15%; слабopоложительный – альтерация лейкоцитов от 16 до 20%; положительный – от 21 – 30%; резко положительный – лизис клеток от 31% и выше.

На втором этапе в качестве объекта исследования использовали кровь иммунизированных морских свинок, распределенных на четыре опытные группы по пять особей в каждой, и кровь от животных из контрольной группы. Животных опытных групп примировали препаратами КС однократно подкожно в область правого бедра, в дозе 95 мкг/0,5 мл (в пересчете на белок). Морским свинкам контрольной группы вводили в том же объеме изотонический раствор хлорида натрия рН 7,2. Кровь из сердца животного в объеме 1,0 мл забирали на 2, 3, 5, 7, 14 и 21 сутки после иммунизации. Коэффициент лейкоцитоза вычисляли по выше приведенной формуле. Наряду с этим, во всех случаях так же проводили общий анализ крови по стандартной методике [7].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы «Статистика», версия 6 (г. Новосибирск). Достоверными оценивали различия при $p < 0,05$, $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

При сопоставлении данных гематологического исследования у морских свинок, примированных КС *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306, среднее количество общего числа лейкоцитов во все сроки исследования было в пределах от $9,6 \pm 0,6$ до $11,8 \pm 0,9 \times 10^9/\text{л}$, что достоверно не отличалось от данного показателя у интактных животных ($10,6 \pm 0,7 \times 10^9/\text{л}$). У животных иммунизированных КС *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* A-61 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole на 2-е и 3-е сутки имело место незначительное повышение общего числа лейкоцитов в пределах от $12,8 \pm 0,7$ до $13,5 \pm 0,9 \times 10^9/\text{л}$ с последующим снижением к 21 суткам до значений в контрольной группе. Общее число эритроцитов у животных всех опытных групп не отличалось от показателей в контрольной группе ($5,6 \pm 0,4 \times 10^{12}/\text{л}$) и варьировало в пределах $5,7 \pm 0,9$ – $5,9 \pm 0,5 \times 10^{12}/\text{л}$.

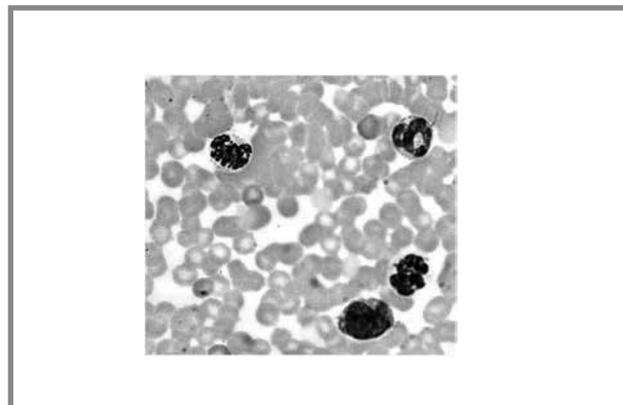
При изучении морфологического состава периферической крови экспериментальных животных установлено, что на ранних сроках наблюдения (2-е и 5-е сутки) в крови животных, иммунизированных КС *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* subsp.

holarctica 306 имело место увеличение эозинофилов (в 3 – 4 раза) по сравнению с контролем. Увеличение числа эозинофилов (эозинофилию) можно рассматривать как аллергическую реакцию организма животных на вводимые препараты (рис. 1). К более поздним срокам (14 – 21 сутки) данный показатель снижался до значения в контроле. При введении морским свинкам КС *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* A-61 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole на 3-е, 5-е и 7-е сутки имело место повышение числа овальоядерных моноцитов и широкоплазменных лимфоцитов, указывающее на активацию иммунного ответа на введение этих препаратов. К 14-м суткам в этих опытных группах показатели лейкограммы не отличались от значений в контроле.

Результаты взаимодействия лейкоцитов крови интактных морских свинок с КС *F. tularensis* разных подвидов в условиях *in vitro* представлены в таблице 1. Процент лизированных лейкоцитов крови, примированных КС *F. tularensis* 15 НИИ-ЭГ и *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306 составил $18,9\% \pm 1,7$ и $18,7\% \pm 1,3$ соответственно, что в 1,9 и в 2,7 раза превышало альтерацию лейкоцитов крови животных, примированных КС *F. tularensis* subsp. или *mediaasiatica* A-61, и КС *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole соответственно. Данное обстоятельство указывает на реакцию гиперчувствительности немедленного типа в ответ на введения антигена – аллергическую реакцию, которую можно расценивать в первом случае как слабopоложительную (КС *F. tularensis* 15 НИИ-ЭГ и *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306) и сомнительную во втором случае (КС *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* A-61 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole).

На следующем этапе исследования оценивали действие КС *F. tularensis* разных подвидов в условиях *in vivo* на клетки крови морских свинок, иммунизированных этими препаратами. В крови экспериментальных животных, иммунизированных КС *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* A-61 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole во все сроки наблюдения количество разрушенных лейкоцитов не превышало 15%, что указывает на отсутствие специфической сенсibilизации организма экспериментальных животных на введение данных

Рисунок 1.
Кровь морской свинки. 2-е сутки после иммунизации КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306. Эозинофилия. Окраска по Романовскому-Гимзе, увеличение 10 x 100



препаратов. В случае применения КС *F. tularensis* 15 НИИ-ЭГ и *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306 на 2-е и 3-и сутки установлена положительная реакция лейкоцитоллиза (количество разрушенных лейкоцитов на 2-е сутки составило $24,6 \pm 1,3$ и $22,4 \pm 0,9$ соответственно, а на 3-и сутки – $20,7 \pm 1,8$ и $26,4 \pm 1,6$ соответственно). На 5 – 14-е сутки выявлено снижение коэффициента лейкоцитоллиза, который не превышал 20% (рис. 2). К 21 суткам только в случае иммунизации морских свинок КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306 альтерация лейкоцитов оставалась слабopоложительной ($K > 15\%$).

Выводы

1. Сравнительное изучение морфологического и количественного состава клеток крови экспериментальных животных, иммунизированных КС показало, что независимо от подвиговой принадлежности штаммов-продуцентов, полученные препараты нетоксичны для морских свинок.
2. На ранних сроках наблюдения (2 – 7 сутки) установлено у экспериментальных животных, иммунизированных КС, повышение показателей индекса лейкоцитоллиза, которые к 21 суткам достоверно не отличались от значений в контроле.
3. Изменения, вызванные введением антигенных препаратов КС *F. tularensis* subsp.

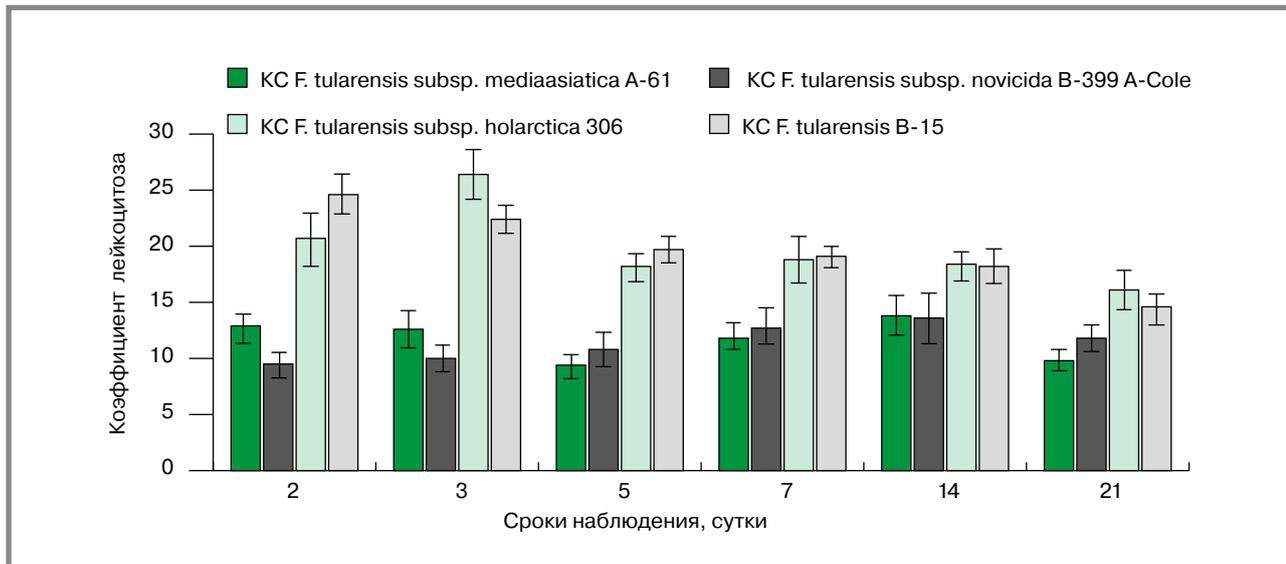
Таблица 1.

Влияние КС *F. tularensis* разных подвидов на неспецифическую сенсibilизацию лейкоцитов крови интактных морских свинок в условиях *in vitro* ($M \pm m$)

Антигенные препараты КС	K, %
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediaasiatica</i> A-61	$9,7 \pm 1,7$
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> B-399 A-Cole	$6,8 \pm 1,1$
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 306	$18,7 \pm 1,3$
<i>F. tularensis</i> 15 НИИ-ЭГ	$18,9 \pm 1,7$
Контроль	0

Рисунок 2.

Влияние KC *F. tularensis* разных подвидов на неспецифическую сенсibilизацию лейкоцитов в крови морских свинок



mediaasiatica A-61 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole. не вызывают аллергизацию организма экспериментальных животных.

4. Увеличение числа эозинофилов и повышение коэффициента лейкоцитолитоза в случае применения препаратов KC *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306 можно

расценивать как аллергическую реакцию организма на введение этих антигенов.

При аллергодиагностике экспериментальных антигенных препаратов в частности для оценки степени сенсibilизации лейкоцитов крови лабораторных животных может быть использован данный метод с учетом простоты постановки и информативности. ■

Литература

1. Чурилов Л. П., Васильев А. Г. Патология иммунной системы: Учебное пособие. Санкт-Петербург: «Издательство ФОЛИАНТ». 2014: 664.
2. Николаев В.Б. Физико-химические и иммунобиологические свойства антигенов туляремийного микроба: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Иркутск; 2005: 23.
3. Клеточные и гуморальные факторы иммунитета в патогенезе туляремии. С.В. Балахонов, ред. Иркутск; 2017: 136.
4. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. В.В. Меньшиков, ред. Москва; 1987: 365.
5. Фирстова В.В. Экспериментально-иммунологические особенности обоснование выбора стратегии оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии: Дис. ... д-ра. биол. наук. Оболенск; 2015: 281.
6. Кузнецова Е.М. Оптимизация способов получения антигенных комплексов туляремийного микроба и конструирование на их основе диагностических препаратов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов; 2011: 22.
7. Методические указания МУ 3.1.2007-05. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за туляремией. 2005.

References

1. Pathophysiology of the immune system. Churilov L.P., Vasiljev A.G.: Saint Petersburg «Foliant». 2014: 664 (in Russian).
2. Nikolaev V.B. Physico-chemical and immunobiological properties of antigens of tularemia microbe. Doctorate of med. sci. diss. Irkutsk; 2005 (in Russian).
3. Cellular and humoral immunity factors in the pathogenesis of tularemia. Ed.: S.V. Balakhonov. Irkutsk; 2017: 136 (in Russian).
4. Laboratory methods in clinic. Ed.: V.V. Men'shikov. Moscow; 1987; 365 (in Russian).
5. Firstova V.V. Experimental study immunological features a choice of strategy assessment of post-vaccination immunity against plague and tularemia. Doctorate of biol. sci. diss. Obolensk; 2015 (in Russian).
6. Kuznetsova E.M. Optimization methods for the preparation of antigenic complexes tularemia microbe and construction on their basis of diagnostic products: Doctorate of biol. sci. diss. Saratov; 2011 (in Russian).
7. Guidelines MU 3.1.2007-05. Prevention of infectious diseases. Epidemiological surveillance of tularemia (in Russian).