

Иммуногенные свойства препаратов клеточных стенок *Francisella tularensis* разных подвидов в условиях экспериментальной туляремии (сообщение 2)¹

А. В. Корнева, В. Б. Николаев, Т. А. Иванова,
В. И. Дубровина (dubrovina-valya@mail.ru), Г. Б. Мухтургин, Е. Ю. Марков,
Т. П. Старовойтова, А. В. Мазепа, Т. Т. Шкаруба, С. В. Балахонов
DOI:10.24411/2073-3046-2018-10005

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора

Резюме

В работе исследованы иммуногенные свойства препаратов клеточных стенок (КС) туляремийного микроба четырех подвидов. Показано, что препараты, полученные из мочевиновых лизатов *Francisella tularensis*, не являются токсичными для экспериментальных животных. Кроме того, КС *F. tularensis* A-61 subsp. *mediasiatica* и *F. tularensis* B-399 A-Cole subsp. *tularensis* обладают иммуногенной активностью при экспериментальной туляремии, вызванной *F. tularensis* 306 subsp. *holarctica*.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, туляремия, вакцина, клеточные стенки, иммуногенная активность.

Immunogenic Properties of Cell Wall Preparations of *Francisella tularensis* Different Subspecies in Experimental Tularemia

A. V. Korneva, V. B. Nikolaev, T. A. Ivanova, V. I. Dubrovina (dubrovina-valya@mail.ru), G. B. Mukhturgin, E. Yu. Markov, T. P. Starovoitova, A. V. Mazepa, T. T. Shkaruba, S. V. Balakhonov

DOI:10.24411/2073-3046-2018-10005

Irkutsk Antiplague Research Institute of of Federal Service of Surveillance on Consumer' Rights Protection and Human Wellbeing

Abstract

Immunogenic properties of cell wall (CW) preparations of *Francisella tularensis* four subspecies are investigated. It is shown that the preparations from *F. tularensis* urea lysates are not toxic for experimental animals. Besides, CW of *F. tularensis* A-61 subsp. *mediasiatica* and *F. tularensis* B-399 A-Cole subsp. *tularensis* possess immunogenic activity in experimental tularemia caused by *F. tularensis* 306 subsp. *holarctica*.

Keywords: *Francisella tularensis*, tularemia, vaccine, cell wall, immunogenic activity.

Введение

Туляремия – зоонозная инфекция, природные очаги которой широко распространены во всем Северном полушарии в пределах умеренного климатического пояса, в том числе на территории Российской Федерации, и приурочены к различным климатическим зонам с разнообразными ландшафтами. Возбудитель туляремии *Francisella tularensis* изолирован от 200 видов млекопитающих, птиц, рептилий и рыб [1], однако главным природным резервуаром туляремийного микроба являются грызуны и зайцеобразные. Заражение происходит контактным, трансмиссивным, алиментарным и аспирационным путями.

Внутри вида *Francisella tularensis* выделяют четыре подвида: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*. Перечисленные подвиды отличаются между собой по степени патогенности

и вирулентности. Наиболее вирулентен для человека подвид *tularensis*. На территории РФ в основном циркулируют и выделяются культуры голарктического (*holarctica*) подвида возбудителя туляремии, обладающие умеренной патогенностью для человека и животных и различающиеся по чувствительности к эритромицину, что позволяет дифференцировать штаммы туляремийного микроба на два биологических варианта: биовар I *Ery(s)* и биовар II *Ery(r)*. Согласно литературным данным, штаммы подвида *mediasiatica*, способные вызывать инфекцию у человека, до 2011 г. выделялись только на территории Средней Азии. В 2011 г. впервые были выделены штаммы туляремийного микроба среднеазиатского подвида на территории Алтайского края [2].

В связи с высокой вирулентностью и контагиозностью, а так же возможностью заражения

¹ Сообщение 1: Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2014; 4 (77): 73–77.

трансмиссивным и аспирационным путем, *F. tularensis* внесена в список потенциально опасных агентов биотерроризма [3].

Одним из наиболее эффективных методов борьбы с туляремией является вакцинопрофилактика. В настоящее время для специфической иммунопрофилактики туляремии в РФ используется живая туляремийная сухая вакцина (ЖТВ) на основе клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ [4], ставшего прототипом для создания живой вакцины LVS, получившей распространение в США. При том, что ЖТВ одна из наиболее эффективных бактериальных вакцин, она имеет ряд недостатков, связанных, в первую очередь, с диссоциацией штамма при культивировании на питательных средах, а так же её остаточной вирулентностью.

Локализация антигенных детерминант (липополисахаридов, белков наружных мембран) на поверхности клеток туляремийного микроба, формирующих его характерную полиэпитопную антигенную структуру, а также данные о высокой протективной активности субклеточных фракций [5] и белков наружных мембран грамотрицательных бактерий [6, 7] обуславливают возможность использования при создании безопасных и эффективных иммунопрофилактических и диагностических средств в качестве антигенов структурные элементы клеток *F. tularensis*. Перспективным является способ получения препаратов субклеточных фракций возбудителя туляремии путем обработки микробной массы мочевиной и последующей инкубацией при 37 °С. Установлено, что обработка раствором мочевины живых туляремийных клеток позволяет получать специфически стерильные лизаты для выделения субклеточных фракций с высоким содержанием белков (от 43 до 78 % сухой массы) и сохранением их иммунобиологических свойств [8, 9].

Цель исследования – изучение иммуногенной активности препаратов клеточных стенок туляремийного микроба разных подвидов у белых мышей, зараженных вирулентным штаммом *F. tularensis* 306 subsp. *holarctica*.

Материалы и методы

В работе были использованы шесть штаммов живых культур: *F. tularensis* Utah 112 subsp. *novicida* (авирулентен для белых мышей в дозах 10–100 м. к.), *F. tularensis* A-61 subsp. *mediasiatica* (ЛД₅₀ для белых мышей – 1 м. к.), *F. tularensis* B-399 A-Cole subsp. *tularensis*, *F. tularensis* 21/400 subsp. *holarctica*, *F. tularensis* 306 subsp. *holarctica*, *F. tularensis* 15 НИИЭГ subsp. *holarctica* (вакцинный, ЛД₅₀ для белых мышей – 2 × 10⁶ м. к.), полученных из музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института.

Препараты клеточных стенок (КС) получали лизисом живых клеток *F. tularensis* раствором мочевины с последующим дифференциальным

центрифугированием [8]. Содержание белка определяли по методу Лоури с соавт. или в его модификациях, углеводов – в реакции с фенолом после гидролиза препаратов в 2 н. H₂SO₄ в течение 2 часов при 95 °С.

Экспериментальные исследования были выполнены на животных, полученных в лаборатории подопытных животных ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора от маточного поголовья сертифицированных беспородных белых мышей из НПО «Вектор».

Опыты по исследованию токсичности препарата проводили согласно основным положениям РД 42-28-8-89 «Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов».

Для расчета полуэффективной дозы (ЕД₅₀) КС туляремийного микроба мышей массой 18–20 г обоих полов (по шесть особей в группе) иммунизировали препаратами исследуемых штаммов *F. tularensis* подкожно в область правого бедра в дозах 23,75, 47,5 и 95,0 мкг/мышь в объеме 0,5 мл физиологического раствора. Контрольной группой служили мыши, получившие подкожно по 0,5 мл физиологического раствора. На 14-е и 28-е сутки после иммунизации проводили заражение животных вирулентным штаммом *F. tularensis* 306 subsp. *holarctica* подкожно в область левого бедра дозой 100 DCL. Животные после заражения находились под наблюдением в течение 14-ти дней. Для определения иммунобиологических свойств препарата оптимальной была выбрана доза иммунизации 95,0 мкг/мышь.

Работа с животными проводилась в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных приказом МЗ СССР от 12.08.1977 г. №755 и Приложения к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. №708н. Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами лабораторной практики», утвержденных Приказом Минздрава России № 267 от 19.06.2003 и «Принципами надлежащей лабораторной практики» (Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009).

Величину средней эффективной дозы (ЕД₅₀) испытуемых препаратов вычисляли по методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина и А. А. Воробьева.

Реакцию лейкоцитолитиза проводили по стандартной методике [10].

Результаты исследования

Для оценки реактогенности исследуемых препаратов велось наблюдение за изменением температуры тела и веса иммунизированных лабораторных животных. Температура тела животных опытных групп не превышала значения таковой у контрольных животных. В течение семи

суток после иммунизации была отмечена только положительная динамика изменения веса. Привес в контрольной группе составил 4,4 г, у животных опытных групп – от 3,4 до 7,0 г.

Во все сроки эксперимента патологоанатомические изменения на месте введения препаратов при наружном осмотре выявлены не были. При вскрытии у животных, иммунизированных препаратами *F. tularensis* 306 subsp. *holarctica* и *F. tularensis* 21/400 subsp. *holarctica*, в тканях и паренхиматозных органах изменения отсутствовали. При инокуляции препаратов *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112, *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61 изменения регистрировались только в селезенке и регионарном лимфатическом узле, что, возможно, указывает на иммунную перестройку макроорганизма.

Результаты экспериментов показали, что исследуемые препараты в дозах 6,3; 19,0; 57,0 и 100,0 мкг не обладают токсичностью. Кроме того, ранее нами было установлено, что КС *F. tularensis* стимулируют продукцию ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-2, ГМ-КСФ и Г-КСФ иммунокомпетентными клетками экспериментальных животных в условиях *in vivo* [8, 11], а также оказывают влияние на активацию Т- и В-лимфоцитов клеток крови белых мышей [12].

Реакция специфического лейкоцитоза указывает на то, что только на ранних сроках наблюдения

(2–7-е сутки) происходит повышение индекса разрушения лейкоцитов, который к 21-м суткам существенно понижается и соответствует показателям в контрольной группе животных. Важно отметить, что изменения, вызванные введением КС *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole не вызывают аллергизации организма экспериментальных животных. В то же время, увеличение числа эозинофилов и повышение коэффициента лейкоцитолита в случае применения КС *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306 можно рассценивать как аллергическую реакцию организма на введение этих антигенов.

Определение величины ED_{50} для оценки иммуногенной активности исследуемых препаратов показало, что защиту лабораторных животных от гибели при экспериментальной туляремии, вызванной вирулентным штаммом голарктического подвида обеспечивали препараты КС *F. tularensis* A-61 subsp. *mediasiatica* при заражении на 14-е сутки после иммунизации, а также *F. tularensis* A-61 subsp. *mediasiatica* и *F. tularensis* B-399 A-Cole subsp. *tularensis* на 28-е сутки (табл. 1). Максимальной иммуногенной активностью обладал препарат КС, выделенный из клеток *F. tularensis* B-399 A-Cole subsp. *tularensis*. В контрольной группе животных была зарегистрирована 100% гибель на 5–6-е сутки.

Таблица 1.

Иммуногенная активность препаратов клеточных стенок штаммов *F. tularensis* разных подвигов мышей при заражении на 14-е и 28-е сутки после иммунизации

Препарат	ED_{50} (мкг/на животное) ($ED_{50}^{min} \div ED_{50}^{max}$) = 23,8 \div 95,0 павших/ выживших		Количество животных		Средняя продолжительность жизни животных павших/общая	
	14-е сутки	28-е сутки	павших/ выживших 14-е сутки	28-е сутки	14-е сутки	28-е сутки
КС <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ subsp. <i>holarctica</i>	> 134,0	131,8	6/6	6/6	6,0/6,0	7,5/7,5
КС <i>F. tularensis</i> 21/400 subsp. <i>holarctica</i>	> 134,0	131,8	6/6	6/6	4,8/4,8	5,2/5,2
КС <i>F. tularensis</i> 306 subsp. <i>holarctica</i>	> 134,0	95,0	6/6	5/1	8,2/8,2	5,8/7,2
КС <i>F. tularensis</i> Utah 112 subsp. <i>novicida</i>	>134,0	118,0	6/6	6/6	5,0/5,0	5,0/5,0
КС <i>F. tularensis</i> A-61 subsp. <i>mediasiatica</i>	87,1	74,8	3/3	4/2	7,0/11,2	8,3/10,2
КС <i>F. tularensis</i> B-399 A-Cole subsp. <i>tularensis</i>	> 134,0	51,5	6/6	2/4	7,5/7,5	8,5/12,2
Физиологический раствор	–	–	6/6	6/6	5,0/5,0	5,8/5,8

Таким образом, экспериментальные препараты КС *F. tularensis* независимо от подвиговой принадлежности не являются токсичными для экспериментальных животных. Этот факт подтверждается результатами патоморфологических исследований органов белых мышей, иммунизированных этими препаратами, а также показателями жизнеспособности клеток крови при взаимодействии с КС *F. tularensis* в условиях *in vitro*.

Применяемые в большинстве исследований способы обеззараживания микробной массы (кипячение, обработка формалином или фенолом) и различные методы выделения субклеточных фракций в значительной степени оказывают деструктивное воздействие на биологические свойства клеточных структур, в том числе белков микробной клетки, что объясняет некоторые встречаемые противоречия в опубликованных данных о свойствах туляремийных наружных мембран и их составляющих [13, 14]. Поиск щадящих способов инактивации микробной массы, позволяющих получать специфически стерильные препараты субклеточных фракций, с сохранением биологических свойств, остается актуальным.

Выводы

1. Полученные из мочевиных лизатов препараты КС *F. tularensis* A-61 subsp. *mediasiatica* и *F. tularensis* B-399 A-Cole subsp. *tularensis*, являясь комплексными антигенами со сложными физико-химическими свойствами [4], обладают иммуногенной активностью в отношении штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306.
2. Полученные новые данные свидетельствуют о возможности применения КС туляремийного микроба для повышения резистентности организма экспериментальных животных в отношении *F. tularensis*.
3. На основании результатов исследования существует необходимость дальнейшего комплексного изучения иммуногенных свойств КС *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole в качестве перспективных компонентов при конструировании вакцин против туляремии и диагностических препаратов.

Литература

1. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1105: 1–29.
2. Мокриевич А. Н., Тимофеев В. С., Кудрявцева Т. Ю., Уланова Г. И., Карбышева С. Б., Миронова Р. И. и др. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1: 66–69.
3. Онищенко Г. Г., Сандакчиев Л. С., Нетесов С. В., Мартынюк Р. А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. *Вестник РАН.* 2003; 3 (73): 195–204.
4. Волох О. А., Комиссаров А. В., Антонычева М. В., Лобовикова О. А., Авдеева Н. Г., Вахрушина Н. И. и др. Совершенствование технологии получения живой туляремийной вакцины. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 3: 81–84.
5. Марков Е. Ю., Николаев В. Б., Загоскина Т. Ю., Половинкина В. С., Иванова Т. А., Сатто С. Г. и др. Протективная активность субклеточных фракций *Yersinia pestis* при экспериментальной чуме у белых мышей. *Бюлл. ВСНЦ СО РАМН.* 2004; 3 (64): 123–127.
6. Hickey A. J., Hazlett K. R. O., Kirimanjeswara G. S., Metzger D. W. Identification of *Francisella tularensis* outer membrane protein A (FopA) as a protective antigen for tularemia. *Vaccine.* 2011; 29 (40): 6941–6947.
7. Huntley J. F., Conley P. G., Rasko D. A., Hagman K. E., Apicella M. A., Norgard M. V. Native Outer Membrane Proteins Protect Mice Against Pulmonary Challenge with Virulent Type a *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2008; 76: 3664–3671.
8. Корнева А. В., Николаев В. Б., Ястремская К. Ю., Марков Е. Ю., Войткова В. В., Соловьев С. Ю. и др. Результаты изучения иммуногенной активности клеточных оболочек *Francisella tularensis* разных подвигов (сообщение 1). *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2014; 4 (77): 73–77.
9. Корнева А. В., Николаев В. Б., Козлов С. Н., Марков Е. Ю., Мазепа А. В., Попова Ю. О. Выявление мембрансвязанных протеаз *Francisella tularensis*. *Бюлл. ВСНЦ СО РАМН.* 2016; 1(5): 155–159.
10. Практическое руководство. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Г. Г. Онищенко, В. В. Кутырев, ред. Москва: Медицина, Шико; 2009.
11. Корнева А. В., Николаев В. Б., Ястремская К. Ю., Марков Е. Ю., Войткова В. В., Соловьев С. Ю. и др. Результаты изучения иммуногенной активности клеточных оболочек *Francisella tularensis* разных подвигов (сообщение 2). *Бюлл. ВСНЦ СО РАМН.* 2015; 1 (101): 63–66.
12. Balakhonov S. V., Dubrovina V. I., Voitkova V. V., Korytov K. M., Starovoitova T. P., Ivanova T. A. et al. Cell envelopes of *Francisella tularensis*: immunogenic activity and toxicity. *J. Cell. Biology Cell. Metab.* 2017; 4 (1): 14–17.
13. Huntley J.F., Conley P.G., Hagman K.E., Norgard M.V. Characterization of *Francisella tularensis* Outer Membrane Proteins. *J. Bacteriol.* 2007; 2(189): 561–574.
14. Кузнецова Е. М., Волох О. А., Шепелёв И. А., Никифоров А. К. Компонентный состав протективного антигенного комплекса туляремийного микроба. *Мол. генетика, микробиол., вирусол.* 2012; 3: 22–25.

References

1. Sjöstedt A. Tularemia: History, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1105: 1–29.
2. Mokrievich A. N., Timofeev V. S., Kudryavtseva T. Yu., Ulanova G. I., Karbysheva S. B., Mironova R. I. et al. Isolation of central asian subspecies of tularemia agent in the altai territory. problems of particularly dangerous infections. 2013; 1: 66–69 (in Russian).
3. Onishchenko G. G., Sandakhchiev L. S., Netyosov S. V., Martynuk R. A. Bioterrorism: national and global threat. *bulletin of the russian academy of sciences.* 2003; 73 (3): 195–204 (in Russian).
4. Volokh O. A., Komissarov A. V., Antonycheva M. V., Lobovikova O. A., Avdeeva N. G., Vakhrushina N. I. et al. Enhancement of the technology for live tularemia vaccine production. problems of particularly dangerous infections. 2016; 3: 81–84 (in Russian).
5. Markov E.Yu., Nikolaev V. B., Zagoskina T. Yu., Polovinkina V. S., Ivanova T. A., Sappo S. G. et al. Protective Activity of Subcellular Fractions of *Yersinia pestis* in Experimental Plague in White Mice. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* [Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences]. 2004; 3 (64): 123–127 (in Russian).
6. Hickey A. J., Hazlett K. R. O., Kirimanjeswara G. S., Metzger D. W. Identification of *Francisella tularensis* outer membrane protein A (FopA) as a protective antigen for tularemia. *Vaccine.* 2011; 29 (40): 6941–6947.
7. Huntley J. F., Conley P. G., Rasko D. A., Hagman K. E., Apicella M. A., Norgard M. V. Native outer membrane proteins protect mice against pulmonary challenge with virulent type a *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 2008; 76: 3664–3671.
8. Korneva A. V., Nikolaev V. B., Yastremskaya K. Yu., Markov E. Yu., Voitkova V. V., Soloviev S. Yu. et al. The Results of the study of the immunogenic activity of the cell membranes of *Francisella tularensis* of different subspecies (report 1). *Epidemiologia i Vaccinoprofilactica* [Epidemiology and Vaccinal Prevention]. 2014; 4 (77): 73–77 (in Russian).
9. Korneva A. V., Nikolaev V. B., Kozlov S. N., Markov E. Yu., Mazepa A. V., Popova Yu. O. Detection of membrane-bound proteases of *Francisella tularensis*. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* [Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences]. 2016; 1 (5): 155–159 (in Russian).