

УДК 616.98:579.841.95

## Комплекс Vfr–O-антиген внешних мембран *Francisella tularensis*: получение, характеристика, возможности использования

© 2019 Е.М. КУЗНЕЦОВА<sup>1,\*</sup>, О.А. ВОЛОХ<sup>1</sup>, Я.М. КРАСНОВ<sup>1</sup>, Т.А. ПОЛУНИНА<sup>1</sup>,  
Н.Г. АВДЕЕВА<sup>1</sup>, Ю.И. САМОХВАЛОВА<sup>1</sup>, Д.В. БАДАНИН<sup>1</sup>, М.Н. КИРЕЕВ<sup>1</sup>, В.Г. ГЕРМАНЧУК<sup>1</sup>,  
А.К. НИКИФОРОВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Саратов, 410005

<sup>2</sup>Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012

\*e-mail: rusrap@microbe.ru, kuznetsova.em@mail.ru

Поступила 29.08.2018 г.

После доработки 09.10.2018 г.

Принята к публикации 15.01.2019 г.

Представлен метод выделения комплексного антигена белково-углеводной природы из внешних мембран клеток вакцинного штамма *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и дана его детальная характеристика. В составе антигенного комплекса идентифицированы белок бактериоферритин (Vfr) и O-антиген. Показано, что полученный комплексный антиген нетоксичен, обладает высокой иммуногенной активностью и защищает белых мышей при подкожном заражении вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840. Установлено его присутствие у туляремийного микроба независимо от подвиговой принадлежности и наличия капсулы. Высокая антигенная и иммунобиологическая активность комплекса Vfr–O-антиген создают предпосылки для его дальнейшего применения в качестве компонента при разработке профилактических и диагностических препаратов против туляремийной инфекции.

*Ключевые слова:* *Francisella tularensis*, антигены, белки внешней мембраны, иммуногенность, липополисахарид, O-антиген

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-73-81

Туляремия – острая зоонозная бактериальная природно-очаговая инфекционная болезнь, вызванная *Francisella tularensis*, с разнообразными механизмами передачи возбудителя. По меньшей мере, описано четыре подвида *F. tularensis*, вызывающих заболевания у людей, однако, только *F. tularensis* биовар *tularensis* (тип А) и *F. tularensis* биовар *holarctica* (тип В) являются основными возбудителями заболевания [1, 2]. На территории Российской Федерации природные очаги туляремии распространены повсеместно, прослеживается четкая направленность к расширению зон природной очаговости туляремии и заболеваемости

среди населения [1, 3]. Учитывая широкую распространенность и активность природных очагов туляремии, актуальными остаются исследования, направленные на изучение поверхностных антигенов *F. tularensis* и конструирование на их основе препаратов для профилактики и диагностики туляремийной инфекции [2, 4–7]. В этом аспекте, ряд исследователей отмечают перспективность изучения комплексных антигенов внешних мембран (ВМ) *F. tularensis*, характеризующихся сложной химической природой, наличием в своем составе основных иммунодоминантных белков и выраженными иммуногенными свойствами [8–14].

*Список сокращений:* ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ВМ – внешних мембран; ЕД<sub>50</sub> – средняя иммунизирующая доза; К – коэффициент лейкоцитолита (в %); ЛПС – липополисахарид; моноАТ – моноклональные антитела; ОП<sub>600</sub> – оптическая плотность при длине волны 600 нм; ПАК – протективный антигенный комплекс; РА – реакция агглютинации; DCL – абсолютная летальная доза; рI – изоэлектрическая точка.

Одним из таких комплексных препаратов является протективный антигенный комплекс (ПАК) туляремийного микроба, содержащий в своем составе до 8 белковых субъединиц и ЛПС, обладающий высокой протективной активностью при экспериментальной туляремии [9, 15] и используемый при разработке туляремийных иммунодиагностических препаратов [16]. При ферментативном гидролизе ПАК проназой E (КФ 3.4.21) была получена иммунохимически активная фракция (ПАК-М), содержащая О-антиген [15] и только две белковые субъединицы с молекулярными массами около 41–43 и 14–17 кДа.

Цель работы – разработка способа получения ПАК-М из ВМ вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ в препаративных количествах и изучение его компонентного состава, свойств и прикладного потенциала.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Бактериальные штаммы

В работе использовались штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840, *F. tularensis* subsp. *holarctica* КМ 9 (*cap*<sup>+</sup>), *F. tularensis* subsp. *nearctica* В399 А-cole, *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* А-61 (117) КМ 4, *Y. pestis* EV НИИЭГ, *Y. pseudotuberculosis* III и V серотипов из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, Россия).

### Получение антигенных комплексов

ПАК получали с поверхности бактериальных клеток штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ. Для этого штамм-продуцент выращивали до достижения ОП<sub>600</sub> = 3,5 и после инактивации биомассы проводили поэтапное выделение антигенного комплекса по методике, изложенной ранее ([17] с модификацией). Препарат хранился в лиофильно высушенном состоянии при 4 °С. Для выделения гликопротеина использовали препарат ПАК, содержащий до 60% белка, до 25% липидов и до 15% углеводов, в состав которого входили до восьми белковых фракций с молекулярными массами от 10 до 85 кДа (мажорные 81–85, 57–60, 43, 32, 23, 19 и 14–17 кДа) [15].

Для протеолиза ПАК использовали фермент проназу E (Serva, Германия). Активность протеолитического фермента проназы E определяли методом створаживания молочно-ацетатной смеси [18], она составила 46 ед/мг. Соотношение

фермент/субстрат было подобрано опытным путем и соответствовало 1:200 по белку. Ферментативный гидролиз ПАК осуществляли в колбах Эрленмейера в 10–50 мМ трис-буфере (рН 7,8) на термостатируемой качалке (Infors MINITRON II, ДиаэМ) 80 об/мин в течение 6 ч при (37±2) °С. По окончании процесса фермент в составе гидролизата инактивировали нагреванием при (90±5) °С в течение 15 мин. Последующую очистку продукта реакции осуществляли на хроматографе низкого давления Biologic LP (Bio-Rad, США) с применением геля Sephacryl S-300 (колонка 120×1 см). В качестве элюирующего буфера использовали 10мМ Na-фосфатный буфер рН 7,0. На колонку наносили 0,5 мл образца в концентрации 4 мг/мл по белку, скорость элюции составила 0,4 мл/мин. При этом собирали фракцию мажорного третьего пика, обладающую наибольшей иммунохимической активностью, которую и использовали в дальнейшей работе.

### Анализ химического состава

Анализ проводили калориметрическими методами: концентрацию белка определяли по О. Lowry (1951) при длине волны 750 нм с применением набора реактивов «Bio-Rad DC Protein Assay» (Bio-Rad, США); углеводы регистрировали по реакции с тимоловым реактивом при длине волны 509 нм; количество липидов определяли бихроматным методом по J. Amenta (1964) при длине волны 650 нм.

ВЭЖХ проводили на колонке для гель-фильтрации BioSep-SEC-s3000 (Phenomenex, США), размером 300×7,8 мм. Элюентом служил 0,1 М фосфатный буфер рН 7,4, скорость элюции составляла 1 мл/мин. Детекцию осуществляли с помощью проточного спектрофотометра при длине волны 280 нм. Колонка откалибрована производителем с использованием маркеров молекулярного веса от 0,2 до 670 кДа.

Состав белковых фракций исследовали методами электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецил сульфата натрия (SDS-PAGE) по U. K. Laemmli (1970) в 12%-ном разделительном геле. Для получения двумерных гелей использовали набор для изофокусирования «2-D Starter Kit» (Bio-Rad). Иммуноблоттинг проводили по методу H. Towbin (1979) с использованием экспериментальных поликлональных кроличьих антител к ПАК в разведении 1:100, а в качестве конъюгата – антикроличьих антител, меченных пероксидазой (ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва). Для обнаружения белков

в SDS-PAGE использовали окраску Кумасси синим R-250 (ДиаЭм, Германия) и азотнокислым серебром с помощью набора реактивов «Silver Stain» (Bio-Rad). 2D-электрофореграммы анализировали с помощью программного обеспечения Dymension мультифункциональной системы гель-документирования «Syngene» (G:BOX Chemi XT4, UK). Результаты компьютерного анализа содержали информацию об общем количестве выявленных пятен образцов, их порядковый номер, а также характеристику каждого пятна по интенсивности, молекулярной массе и pI.

При проведении протеомного анализа масс-спектры пептидных карт белков были получены с помощью гидролиза трипсином непосредственно в геле [19] на квадруполь-время-пролетном масс-спектрометре «Maxis Impact» (Bruker, Германия) на базе ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, в режиме положительных ионов (авто-МС/МС) в диапазоне 150–2200 m/z. Средняя точность предварительной калибровки масс-спектрометра по Na Formate (pos) перед каждым разом составила 0,420 ppm. Идентификация полученных пептидных спектров проведена с помощью сервера MASCOT v. 2.6 (опция «МС/МС поиск ионов») в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2016) по соотношению значений масс пептидов в спектре с первичной структурой после трипсинолиза, с учетом их возможных модификаций. Белки, имеющие критерии достоверности (score) больше 70, считаются идентифицированными надежно ( $p < 0,05$ ).

### Изучение иммуногенных свойств

Уровень антител в сыворотке крови иммунизированных лабораторных животных оценивали в непрямом иммуноферментном анализе (ИФА) с использованием препарата ПАК-М (10 мкг/мл) в качестве сенситина. Конъюгатом служили соответствующие антивидовые антитела, меченные пероксидазой в рабочем разведении. В качестве биомоделей в работе использовали беспородных белых мышей (18–20 г) и морских свинок (200–250 г). Постановку и учет реакции лейкоцитолита осуществляли по стандартной методике [20]. ЕД<sub>50</sub> рассчитывали по методу Г. Кербера в модификации И.П.Ашмарина и А.А. Воробьева [21]. Все работы с животными проводили в соответствии с протоколом исследования, утвержденным биоэтической комиссией института «Микроб» в условиях вивария ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» с уровнем биологической безопасности BCL 3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение ПАК-М

Опираясь на полученные ранее данные о составе и иммунохимической активности тулярийного микроба, была разработана схема его выделения из биомассы вакцинного штамма *F. tularensis* 15НИИЭГ. С целью повышения технологичности выделения ПАК-М была уменьшена кратность гидродинамической обработки клеток с четырех до двух, подобраны время и условия протеолиза, подобрано соотношение фермент/субстрат, условия хроматографической очистки и контроля электрофоретической чистоты и специфической активности препарата (рис. 1).

### Химический состав и иммунохимическая активность ПАК-М

Изучение химического состава позволило установить, что процентное содержание белка в нем  $62 \pm 3\%$ , углеводов  $30 \pm 7,0\%$ , липиды отсутствуют. Выход препарата составил  $13 \pm 1,2\%$  от исходного количества белка в ПАК, с иммунохимической активностью в ИФА  $15 \pm 1,2$  нг/мл. На рис. 2 показан профиль элюции исследуемого антигенного комплекса при ВЭЖХ, свидетельствующий о гомогенности ПАК-М, молекулярная масса которого, установленная этим методом, была порядка  $(78 \pm 1)$  кДа.

С помощью SDS-PAGE было установлено наличие в составе ПАК-М двух белковых субъединиц с молекулярными массами около 14–17 и 41–43 кДа, последний идентифицировался только при окраске гелей азотнокислым серебром. Обе субъединицы обладали иммунореактивностью и взаимодействовали в иммуноблоттинге с гипериммунной поликлональной кроличьей сывороткой к ПАК *F. tularensis* 15НИИЭГ. Кроме того, с помощью моноклональных антител (моноАТ) 1D6 к ЛПС *F. tularensis* в составе полученного препарата был идентифицирован O-полисахаридный компонент, в то время как липид А отсутствовал (рис. 3).

При исследовании ПАК-М в 2-D-электрофорезе под влиянием денатурирующих условий антиген разделялся на четыре белковых пятна попарно (рис. 4a, отмечены стрелками) с pI в диапазонах 4,27–4,52 и 5,79–5,96, с молекулярными массами 43,0 и 16,0 кДа. Иммунореактивностью обладали белковые пятна с молекулярной массой 16,0 кДа, с pI в диапазоне 4,9–5,96 (рис. 4b, очерчено овалом).

Далее, в результате протеомного анализа в составе ПАК-М был надежно идентифицирован один белок – бактериоферритин (bacterioferritin, Bfr)



Рис. 1. Схема получения ПАК-М *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Fig. 1. Scheme of the PAC-M obtaining from *F. tularensis* 15NIIЭГ

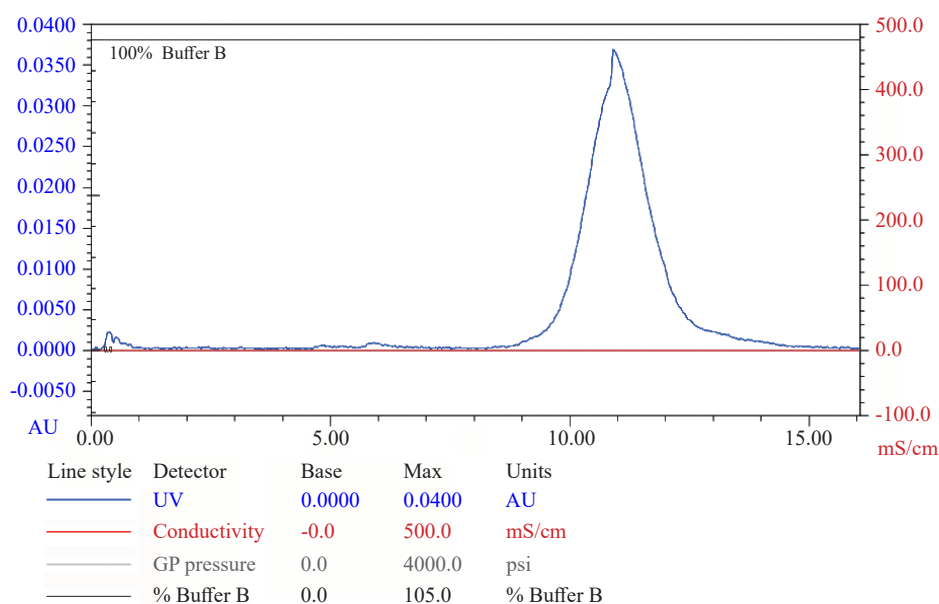
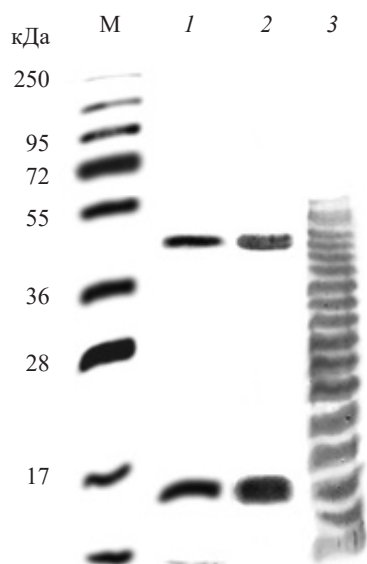


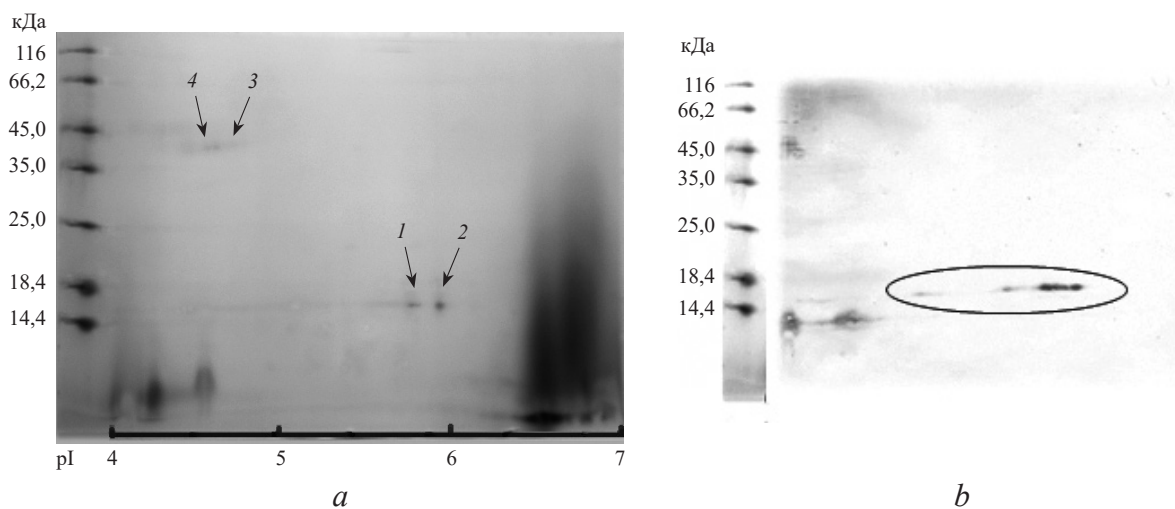
Рис. 2. Профиль элюции препарата ПАК-М *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученный при ВЭЖХ

Fig. 2. HPLC elutions profile of PAC-M obtained from *F. tularensis* 15NIIЭГ



**Рис. 3.** Результаты SDS-PAGE и иммуноблоттинга ПАК-М туляремийного микроба. 1 – белковый профиль, полиакриламидный гель окрашен азотнокислым серебром; 2 – иммуноблоттинг с кроличьей сывороткой к ПАК *F. tularensis* 15НННЭГ; 3 – иммуноблоттинг с моноАТ 1D6; М – маркер молекулярной массы

**Fig. 3.** SDS-PAGE and immunoblot of *F. tularensis* PAC-M. Silver stained SDS-PAGE protein profile (lane 1); immunoblot with rabbit anti-*F. tularensis* 15NIIEG PAC serum (lane 2); immunoblot with anti-*F. tularensis* 15NIIEG LPS MAbs 1D6 (lane 3); the positions of molecular mass standards in kDa are indicated (lane M)



**Рис. 4.** Результаты 2-D-SDS-PAGE и иммуноблоттинга ПАК-М туляремийного микроба: а – белковый профиль, полиакриламидный гель окрашен Кумасси синим R-250. 1–4 – номера белковых пятен, соответствуют номерам в табл. 1; б – иммуноблоттинг с кроличьей сывороткой к ПАК *F. tularensis* 15НННЭГ

**Fig. 4.** 2D SDS-PAGE and 2D immunoblot of *F. tularensis* PAC-M. Coomassie blue-stained 2D-PAGE protein profile (a); immunoblot with rabbit anti-*F. tularensis* 15NIIEG PAC serum (b). 1–4 – identified protein spots are designated by numbers related to Table 1

Таблица 1

**Результат компьютерного анализа выявленных пятен на 2D-электрофореграмме препарата ПАК-М с помощью программного обеспечения Dymension мультифункциональной системы гель-документирования «Syngene» (G:BOX Chemi XT4, UK)**

**The result of a computer analysis of the identified protein spots on a 2D electrophoregram of the ПАК-М using the Dymension multi-functional system software Gel Documentation “Syngene” (G: BOX Chemi XT4, UK)**

Порядковый номер пятна	Интенсивность пятна	pI	Молекулярная масса, Да
1	37,252	5,79	15669
2	38,280	5,96	15717
3	15,411	4,52	42635
4	9,057	4,27	42543

массой 18452 Да, соответствующий варианту, присутствующему у штамма OSU18 (*F. tularensis* subsp. *holarctica*, gi|115129393), а также у штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* 257 (*F. tularensis* subsp. *holarctica*, gi|134253174) и FTNF002-00 (*F. tularensis* subsp. *holarctica*, gi|164551621). Кроме того, в составе полученного антигенного комплекса было отмечено присутствие белка GroEL массой 57397 Да (*F. tularensis*, i|1770287). Оба белка находясь в составе исходного ПАК туляремийного микроба, относятся к белкам-шаперонам и, согласно литературным данным, являются иммуногенами, стимулирующими выработку Т-клеток и гамма-интерферона в организме лабораторных животных [22–27].

### Характеристика иммунобиологических свойств комплексного антигена

На основании иммунопротеомного анализа препарата ПАК-М, было сделано предположение о его высокой иммунобиологической активности. На следующем этапе были проведены эксперименты с использованием биомоделей для оценки иммуногенности комплексного антигена, его токсичности и протективности при экспериментальной туляремии.

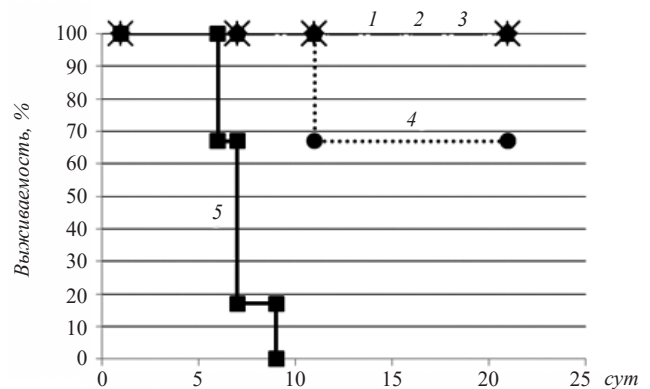
Анализ токсичности препарата ПАК-М проводили на моделях белых мышей и морских свинок. В первом случае вводили белым мышам внутрибрюшинно 1 мг, а во втором – морским свинкам подкожно 5 мг препарата в 0,5 мл 0,86%-ном растворе NaCl (рН 7,2). Контрольным животным в обоих случаях вводили равный (0,5 мл) объем 0,86%-ного раствора NaCl (рН 7,2). Животных взвешивали до опыта и далее ежедневно в течение 7 сут (белые мыши) и 20 сут (морские свинки). В конце срока наблюдения увеличение массы тела у белых мышей отмечалось в среднем на 5,6%, у морских свинок – на 24,5%. Об отсутствии токсичности препарата судили по 100%-ной выживаемости подопытных животных. Уменьшение веса у экспериментальной группы в течение всего срока не наблюдалось. Осмотр места введения также показал отсутствие каких-либо местных реакций (гиперемия, инфильтрат). Было установлено, что препарат ПАК-М на экспериментальных животных (белые мыши и морские свинки) не оказывает токсичное действие.

После однократной подкожной иммунизации морских свинок ПАК-М в дозе 1 мг антительный ответ регистрировался на 22-е сутки (титр 1/80 в ИФА), резко положительная реакция лейкоцитоза была на 28-е сутки ( $K=35\%$ ). При последующем заражении на 30-е сутки после иммунизации вирулентным штаммом *F. tularensis* subs. *tularensis* 503 в дозе 1000 DCL было установлено до-

стоверное увеличение продолжительности жизни животных по сравнению с контрольной группой (вводили равный объем 0,86%-ный раствор NaCl рН 7,2). Средняя продолжительность жизни иммунизированных морских свинок составила  $14,2 \pm 0,5$  сут при 100%-ной гибели контрольной группы на  $8,3 \pm 0,7$  сут.

При использовании в качестве биомодели белых мышей, которым вводили однократно подкожно 20 мкг препарата ПАК-М, резко положительная реакция лейкоцитоза отмечалась на 7-е сутки ( $K=33\%$ ), антительный ответ регистрировался на 7-е сут (титр в ИФА 1/40–1/80), с максимумом на 14-е сут (титр в ИФА 1/80–1/160) и последующей стабилизацией уровня до конца срока наблюдения (титр в ИФА 1/40).

В «остром» опыте было показано, что однократное подкожное введение ПАК-М (максимальная доза 570 мкг с последующей титрацией с шагом в 5) защищает в среднем 91,7% белых мышей при экспериментальной туляремии, вызванной штаммом голарктического подвида, при 100%-ной гибели животных в группе отрицательного контроля. ЕД<sub>50</sub> составила  $2,5 \pm 0,3$  мкг при заражении *F. tularensis* subs. *tularensis* 503 в дозе 100 DCL. Данные выживаемости 30 мышей (6 мышей на группу) представлены в виде кривых выживаемости Каплана-Мейера (рис. 5).



**Рис. 5.** Иммуногенность ПАК-М туляремийного микроба *F. tularensis* при подкожном введении белым мышам с последующим заражением *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 в дозе 100 DCL ( $10^2$  КОЕ). Иммунизирующие дозы: 1 – 570 мкг (без разведения); 2 – 114 мкг (1:5), 3 – 22,8 мкг (1:25), 4 – 4,56 (1:125) мкг, 5 – отрицательный контроль

**Fig. 5.** Immunogenicity of PAC-M *F. tularensis* for white mice. Survival rate of mice immunized with *F. tularensis* PAC-M antigen in the dosage of 570 µg, 114 µg, 22,8 µg, 4,56 µg, and followed by challenges with *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 100 DCL ( $10^2$  CFU)

На следующем этапе был проведен анализ диагностической значимости комплексного антигена. Входящие в его состав специфические для *F. tularensis* белки, согласно литературным данным [5, 12], могут быть использованы в тест-системах для детекции противотуляремийных антител. В настоящей работе было показано, что непрямым ИФА на основе ПАК-М в качестве сенситина (концентрация 10 мкг/мл) могут быть выявлены антитела к туляремийному микробу в экспериментальных и коммерческих сыворотках. Для упрощения постановки анализа в качестве конъюгата был использован белок А меченный пероксидазой (Calbiochem, США) в рабочем разведении 1/10000. Было установлено, что титр противотуляремийных антител в сыворотках гипериммунизированных кроликов составлял 1/1600–1/3200, а в сыворотках экспериментальных животных при определении динамики антител к ПАК *F. tularensis* 15 НИИЭГ в разные сроки от начала иммунизации (белых

мышей иммунизировали подкожно двукратно в дозе 10 мкг морских свинок – подкожно однократно в дозе 1 мг) – 1/150–1/800. (табл. 2).

Современные ИФА тест-системы для детекции возбудителя разработаны на основе специфических антител к ЛПС *F. tularensis* [4,11,12,20]. В состав ПАК-М кроме специфичных белков *F. tularensis* входит О-антиген, являющийся частью диагностически значимого ЛПС. В связи с этим было сделано предположение о возможности использования специфических антител к ПАК-М для детекции возбудителя. Были получены экспериментальные поликлональные кроличьи антитела к ПАК-М, на основе которых были сконструированы пероксидазные конъюгаты. Активность иммуноглобулиновых препаратов была проверена в сэндвич варианте иммуноферментного анализа (сэндвич-ИФА) на штаммах *F. tularensis*, использованных в работе, и в среднем составила  $(5,2 \pm 0,5) \cdot 10^5$  м.к./мл, независимо от подвиговой принадлежности штамма и

Таблица 2

**Чувствительность и специфичность непрямого ИФА на основе ПАК-М *F. tularensis* для детекции противотуляремийных антител в сыворотках животных**

**Sensitivity and specificity of ELISA based on *F. tularensis* PAC-M for the detection of anti-tularemia antibodies in the sera of animals**

Сыворотка	Чувствительность (реципрокный титр)
Сыворотка диагностическая туляремийная сухая для РА (Иркутский НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока)	3200±560
Экспериментальная сыворотка кролика, иммунизированного водно-солевым экстрактом клеток <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	1600±600
Экспериментальная сыворотка кролика, иммунизированного ПАК ВМ <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	1600±600
Сыворотка мышей, иммунизированных ПАК ВМ <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ (21-е сутки)	160±10
Сыворотка морских свинок, иммунизированных ПАК ВМ <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ (28-е сутки)	600±200
Иммуноглобулины диагностические чумные адсорбированные лошадиные сухие для РА (РосНИПЧИ «Микроб»)	–
Иммуноглобулины диагностические псевдотуберкулезные адсорбированные лошадиные сухие для РА (РосНИПЧИ «Микроб»)	–
Сыворотка холерная О1 адсорбированная кроличья (РосНИПЧИ «Микроб»)	–
Сыворотки интактных (неиммунных) животных (кроличья, лошадиная, мышьяная, морской свинки)	–

*Примечание:* «–» отрицательный результат реакции. Специфичность предлагаемого метода составляла 100% как в отношении интактных сывороток, так и коммерческих гетерологичных антительных препаратов (лошадиных и кроличьих), в разведении 1:20

*Note:* «–» negative reaction. The specificity of the proposed method was 100% for both intact sera and commercial heterologous antibodies (horse and rabbit) in 1:20 dilution

наличия капсулы. Отмечена 100%-ная специфичность для гетерологичных штаммов (*Y. pestis* EV, *Y. pseudotuberculosis*) в концентрации  $10^9$  м.к./мл. Полученные данные позволяют судить о перспективности применения специфических антител к ПАК-М в ИФА тест-системах для детекции возбудителя туляремии.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов были изучены химический состав, белковый профиль, иммунологические свойства и компонентный состав препарата ПАК-М туляремийного микроба. В его составе были идентифицированы белок-шапероны (Bfr) и О-антиген. В экспериментах на лабораторных животных показано, что полученный комплексный антиген нетоксичен, обладает высокой иммуногенной активностью, вызывает достоверное увеличение продолжительности жизни морских свинок и защищает белых мышей при подкожном заражении вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840. Установлено его присутствие у туляремийного микроба независимо от подвиговой принадлежности и наличия капсулы. Высокая антигенная и иммунобиологическая активность ПАК-М туляремийного микроба вызывают интерес к его дальнейшему изучению в качестве компонента при разработке профилактических и диагностических препаратов против туляремийной инфекции.

В целом, использование данных иммунопротеомного анализа повышает эффективность скрининга протективных и диагностически значимых антигенов туляремийного микроба, позволяя на первом этапе *in silico* определять перспективность их дальнейшего препаративного получения и направления практического использования.

Авторы выражают благодарность сотрудникам института «Микроб»: лаборатории молекулярной диагностики И.В. Тереховой за предоставление моноклональных антител, лаборатории геномного и протеомного анализа м.н.с. Н.В. Котовой за практическую помощь при выполнении работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., и др. Туляремия: актуальные вопросы и прогноз эпидемической ситуации на территории Российской Федерации в 2018 г. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2018, (1), 22–29. doi: 10.21055/0370-1069-2018-1-22-29
2. Rowe H.M., Huntley J. From the Outside-In: the *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Frontiers Cellular Infection Microbiology*, 2015, 5(94), 1–20. doi: 10.3389/fcimb.2015.00094
3. Остапенко Н.А., Соловьева М.Г., Казачинин А.А., и др. О вспышке туляремии среди населения Ханты-Мансийска и Ханты-Мансийского района в 2013 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015, (2), 28–32. doi: 10.21055/0370-1069-2015-2-28-32
4. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Алиева Е.В., и др. Антигены и антисыворотки *Francisella tularensis*: к вопросу иммунодиагностики туляремии. *Медицинский Вестник Северного Кавказа*. 2012, (1), 49–52.
5. Горбатов А.А. Панферцев Е.А. Баранова Е.В., и др. Диагностическая значимость рекомбинантного белка GroEL FTT\_1696 для выявления противотуляремийных антител. *Бактериология*, 2017, 2(3), 9–15. doi: 10.20953/2500-1027-2017-3-9-15
6. Sjöstedt A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2003, (6), 66–71. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00002-X
7. Eyles J. E., Unal B., Hartley M.G., et al. Immunodominant *Francisella tularensis* antigens identified using proteome microarray. *Proteomics*, 2007, 7(13), 2172–2183. doi: 10.1002/pmic.200600985
8. Хлебников В.С., Головлев И.Р., Кулевацкий Д.П. и др. Изучение биохимических, антигенных и протективных свойств внешней мембраны возбудителя туляремии. *Мол. генетика, микробиол. вирусол.*, 1991, (7), 15–20.
9. Волох О.А., Кузнецова Е.М., Смолькова Е.А. и др. Экспериментальный препарат для специфической профилактики туляремии. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2013, (2), 73–77. doi: 10.21055/0370-1069-2013-2-73-77
10. Корнева А.В., Николаев В.Б., Иванова Т.А., и др. Иммуногенные свойства препаратов клеточных стенок *Francisella tularensis* разных подвигов в условиях экспериментальной туляремии. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*, 2018, 2(99), 46–49. doi: 10.24411/2073-3046-2018-10005
11. Tärnvik A., Berglund L. Tularaemia. *J. Eur. Respiratory*, 2003, 20, 36–373. doi: 10.1183/09031936.03.00088903
12. Spletstoesser W. D., Tomaso H., Dahouk S. A., et al. Diagnostic procedures in tularemia with special focus on molecular and immunological techniques. *J. Vet. Med.*, 2005, В 52, 249–261. doi: 10.1111/i1439-0450.2005.00863x
13. Chandler J.C., Sutherland M.D., Harton M.R., et al. *Francisella tularensis* LVS surface and membrane proteins as targets of effective post-exposure immunization for tularemia. *J. Proteome Res.*, 2015, 14, 664–675. doi: 10.1021/pr500628k
14. Oh H., Kim C-Y., Kim C-H., et al. A synthetic Tul4 and FopA peptide cocktail of *Francisella tularensis* induces humoral and cell-mediated immune responses in mice. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 26(9), 1613–1619. doi: 10.4014/jmb1602.02022
15. Кузнецова Е.М., Волох О.А., Шепелёв И.А., Никифоров А.К. Компонентный состав протективного антигенного комплекса туляремийного микроба. *Мол. генетика, микробиол. и вирусол.*, 2012, (3), 22–25. doi: 10.3103/S0891416812030044



16. Храмова Е.М., Волох О.А., Шепелёв И.А. и др. Использование «С»-комплекса туляремийного микроба для создания диагностических тест-систем. *Биотехнология*, 2007, (2), 72–77.
17. Шепелёв И.А., Волох О.А., Ерёмин С.А., Дятлов И.А. Оптимизация способа получения С-комплекса туляремийного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2006, 2(92), 61–64.
18. Кушманова О. Д., Ивченко Г. М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. 3-е изд. М.: Медицина, 1983, 272 с.
19. Говорун В.М., Мошковский С.А., Тихонова О.В., и др. Сравнительная характеристика протеомных карт клинических изолятов *Helicobacter pylori*. *Биохимия*, 2003, 68(1), 52–60.
20. Онищенко Г. Г., Кутырев В. В., ред. Практическое руководство. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. 2-е изд. М.: Шико, 2013, 560 с.
21. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1962, 180 с.
22. Ericsson M., Golovliov I., Sandström G., et al. Characterization of the nucleotide sequence of the groE operon encoding heat shock proteins chaperone-60 and -10 of *Francisella tularensis* and determination of the T-cell response to the proteins in individuals vaccinated with *F. tularensis*. *Infect. Immun.*, 1997, 65(5), 1824–1829.
23. Twine S.M., Petit M.D., Shen H., et al. Immunoproteomic analysis of the murine antibody response to successful and failed immunization with live anti-*Francisella* vaccines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 346(3), 999–1008. doi: 10.1016/y.bbrc.2006.06.008
24. Su J., Yang J., Zhao D., et al. Genome-wide identification of *Francisella tularensis* virulence determinants. *Infect. Immun.*, 2007, 75(6), 3089–3101. doi: 10.1128/IAI.01865-06
25. Savitt A.G., Mena-Taboada P., Monsalve G., Benach J.L. *Francisella tularensis* infection-derived monoclonal antibodies provide detection, protection, and therapy. *Clinical Vaccine Immunology*, 2009, 16(3), 414–422. doi: 10.1128/CVI.00362-08
26. Havlasova J., Hernychova L., Halada P., et al. Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Proteomics*, 2002, 2(7), 857–867. doi: 10.1002/1615-9861(200207)2:7<857::aid-prot857>3.0.co;2-I
27. Havlasova J., Hernychova L., Brychta M., et al. Proteomic analysis of anti-*Francisella tularensis* LVS antibody response in murine model of tularemia. *Proteomics*, 2005, (5), 2090–2103. doi: 10.1002/pmic.200401123

## Complex Bfr–O-Antigen of *Francisella tularensis* Outer Membranes: Production, Characteristics and Potential Use

Е.М. KUZNETSOVA<sup>1,\*</sup>, О.А. VOLOKH<sup>1</sup>, Ya.M. KRASNOV<sup>1</sup>, T.A. POLUNINA<sup>1</sup>, N.G. AVDEEVA<sup>1</sup>, Yu.I. SAMOKHVALOVA<sup>1</sup>, D.V. BADANIN<sup>1</sup>, M.N. KIREEV<sup>1</sup>, V.G. GERMANCHUK<sup>1</sup> and A.K. NIKIFOROV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia

<sup>2</sup>Vavilov Saratov State Agrarian University, 410012, Saratov, Russia

\*e-mail: rusrapi@microbe.ru, kuznetsova.em@mail.ru

Received August 29, 2018

Revised October 9, 2018

Accepted January 15, 2019

**Abstract**—A method for the isolation of a complex antigen of protein-carbohydrate nature from outer membranes of the vaccine strain *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 15 NIIEG cells and its detailed characteristics have been described. A protein of bacterioferritin (Bfr) and O-antigen were identified in the antigenic complex. It was shown that the obtained complex antigen is non-toxic, harmless, has high immunogenic activity and protects white mice in the subcutaneous infection with a virulent strain of *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840. This antigen was shown to occur in the tularemia microbe regardless of the subspecies and presence of a capsule. The high antigenic and immunobiological activity of the Bfr–O-antigen complex provides the prerequisites for its further use as a component in the development of preventive and diagnostic drugs against the tularemia infection.

**Key words:** *Francisella tularensis*, antigens, outer membrane proteins, immunogenicity, lipopolysaccharide, O-antigen.

**Acknowledgements** – Authors would like to thank to the staff of the Institute «Microbe»: laboratory of molecular diagnostics I.V. Terekhova for providing us with the monoclonal antibodies, laboratories for genomic and proteomic analysis N.V. Kotova for her excellent technical assistance.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-73-81