

РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ АНТИГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ FRANCISELLA TULARENSIS В ФОРМИРОВАНИИ РЕАКЦИИ АЛЛЕРГИИ У ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Изучение роли ЛПС в индукции противотуляремийного иммунитета у людей и животных. *Материалы и методы.* С помощью реакции лейкоцитоллиза с кровью вакцинированных людей и морских свинок и кожной аллергической пробы (морские свинки) изучена активность различных антигенных препаратов туляремийного микроба, включая высокоочищенные от белковых примесей S- и R-ЛПС. *Результаты.* Показано, что только целые клетки *Francisella tularensis*, убитые в неденатурирующих белок условиях и сохраняющие полноценную структуру S-ЛПС (тулярин⁺), являются индукторами реакции гиперчувствительности замедленного типа. Нарушение структуры ЛПС (тулярин⁻) приводят к достоверному снижению, а денатурация бактериальных белков (при кипячении) вызывает полную утрату иммуностимулирующих свойств препаратов. Очищенные препараты ЛПС и O-полисахаридная фракция S-ЛПС не способны активировать клеточное звено иммунитета. *Заключение.* Наличие ЛПС с полноценной структурой влияет на способность антигенных препаратов *F.tularensis* вызывать аллергическую реакцию, а значит, формировать клеточный противотуляремийный иммунитет. Нельзя исключить, что ЛПС *F.tularensis* выступает в качестве адъюванта и обеспечивает наиболее эффективное представление эпитопов белковых молекул для взаимодействия с рецепторами Т-лимфоцитов.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 22—29

Ключевые слова: реакция гиперчувствительности замедленного типа, ЛПС, клеточный иммунитет, аллергическая реакция, *F.tularensis*, белковые антигены

N.N.Onoprienko, N.V.Aronova, N.V.Pavlovich

ROLE OF VARIOUS ANTIGENIC PREPARATIONS OF FRANCISELLA TULARENSIS IN FORMATION OF ALLERGY REACTION IN HUMANS AND ANIMALS

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Study the role of LPS in induction of anti-tularemia immunity in humans and animals. *Materials and methods.* Activity of various antigenic preparations of tularemia microbe, including highly purified from protein and S- and R-LPS, was studied using leukocytolysis reaction with blood of vaccinated humans and guinea pigs and skin allergy test (guinea pigs). *Results.* Only the whole cells of *Francisella tularensis*, killed in protein non-denaturing conditions and conserving full S-LPS structure (tularin⁺) were shown to be inducers of delayed-type hypersensitivity reaction. Alterations in LPS structure (tularin⁻) results in a significant decrease, and denaturation of bacterial proteins (during boiling) results in a complete loss of immune stimulating properties of the preparations. Purified LPS preparations and O-polysaccharide fraction of S-LPS are not able to activate cell-mediated immunity. *Conclusion.* The presence of LPS with the full structure affects the ability of antigenic preparations of *F.tularensis* to cause allergic reactions, and thus, form cell-mediated anti-tularemia immunity. LPS of *F.tularensis* can not be excluded as an adjuvant and provides the most effective presentation of epitopes of protein molecules for interaction with receptors of T-lymphocytes.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 22—29

Key words: delayed-type hypersensitivity reaction, LPS, cell immunity, allergic reaction, *F.tularensis*, protein antigens

ВВЕДЕНИЕ

В течение многих лет ведутся интенсивные разработки по созданию безопасных противотуляремийных вакцин на основе различных антигенов *Francisella tularensis* [1, 14, 18, 21]. Актуальность этого направления обусловлена, в первую очередь, отсутствием данных по генетическим основам аттенуации живой туляремийной вакцины (ЖТВ), используемой для иммунизации людей. Кроме того, включение *F. tularensis* в категорию А агентов биотерроризма определяет особую важность изучения механизмов формирования противотуляремийного иммунитета. Однако до последнего времени у экспериментаторов отсутствует единое представление о том, какие антигены туляремийного микроба обеспечивают эффективный иммунитет против инфекции. По-видимому, именно этим объясняются неудачные попытки конструирования молекулярных вакцин, которые по своей эффективности не уступали бы ЖТВ [14, 16].

Считается общепризнанным, что ведущую роль в защите против туляремии играет Т-клеточное звено иммунитета, индуцируемое антигенами белковой природы, тогда как гуморальному звену отводят второстепенное значение. При этом показано, что иммунодоминантным антигеном бактериальной клетки и основным активатором антителообразования является липополисахарид (ЛПС) *F. tularensis* [3, 6, 22]. В данной связи, ЛПС рассматривается как основной компонент молекулярной вакцины. В частности, согласно данным литературы, комплекс белков наружной мембраны и ЛПС, С-комплекс поверхностных структур *F. tularensis* обеспечивают определенный иммунитет лабораторных животных против возбудителя [2, 15]. В то же время, в очищенном виде ни ЛПС, ни один из идентифицированных специфичных иммуногенных белков туляремийного микроба (например, Tul-4, For-A и др.) не вызывают формирование эффективной и длительной защиты против вирулентных штаммов *F. tularensis* [3]. Ранее было установлено, что для реализации протективных свойств штаммов бактерии должны синтезировать полноценный S-ЛПС, так как ЛПС-дефектные мутанты утрачивают иммуногенные свойства [11, 13]. Таким образом, роль ЛПС в индукции протективного иммунитета против туляремии нуждается в дальнейших исследованиях.

Как известно, туляремийная инфекция или иммунизация ЖТВ сопровождаются развитием в макроорганизме реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Эта аллергическая реакция является показателем клеточного звена иммунитета против *F. tularensis* и применяется для оценки напряженности специфического иммунитета у людей (реакция лейкоцитолита, кожная туляриновая проба) [4, 10]. Для постановки аллергических тестов применяют тулярин (прогретая при 70°C взвесь бактерий вакцинного штамма *F. tularensis*), который представляет собой сложный комплекс различных антигенов туляремийного микроба. Однако, какие именно компоненты микробной клетки ответственны за аллергизацию организма хозяина и, в частности, участвует ли в этом процессе ЛПС, до настоящего времени окончательно не установлено. Использование изолированных и очищенных от белка препаратов ЛПС разного хемотипа, а также ЛПС-дефектных штаммов может быть полезным для выяснения роли этого биополимера в развитии ГЗТ и, следовательно, в протективном иммунитете против туляремии.

В этой связи, целью настоящей работы явилось изучение роли ЛПС в индукции противотуляремийного иммунитета у людей и животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали вирулентные штаммы *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*), *F. tularensis* 543 (subsp. *mediasiatica*), обозначенные как cap⁺, вакцинный штамм *F. tularensis* 15 (subsp. *holarctica*), а также их авирулентные капсулодефицитные

(сар⁻) ЛПС-дефектные варианты, полученные Н.В.Павлович и др. [8]. Бактерии выращивали на плотной питательной среде Т [9]. Все перечисленные штаммы хранились в лиофильно высушенном состоянии и были получены из музея живых культур института.

Экспериментальные тулярин⁺ и тулярин⁻ получали путем прогревания (70°C, 1 час) суспензии бактерий (10¹⁰ м. кл./мл) *F. tularensis* 15 и *F. tularensis* 15 сар⁻, соответственно. Кроме того, использовали взвесь бактерий *F. tularensis* 15, убитых кипячением в течение 20 мин. В качестве контроля специфичности иммунологических реакций служила взвесь бактерий *Escherichia coli* (10¹⁰ м. кл./мл), подготовленная также, как и тулярин (70°C, 1 час). Препараты S- и R-ЛПС выделяли из бакмассы изогенной пары вирулентного сар⁺ и авирулентного сар⁻ штаммов *F. tularensis* 543 методом R.P.Darveau и R.E.W.Hancock [13]. Подробная характеристика полученных препаратов по наличию примесей белка и нуклеиновых кислот приведена нами ранее [7]. Полисахаридную фракцию S-ЛПС получали уксуснокислым гидролизом (1% уксусная кислота, 100°C, 1 час 30 мин) с последующим диализом гидролизатов против дистиллированной воды и лиофильным высушиванием.

Для изучения показателей противотуляремийного иммунитета у людей использовали кровь и сыворотку сотрудников института, вакцинированных ЖТВ (50 человек). В качестве контроля использовали кровь от интактных неиммунных людей (3 человека). Экспериментальными биологическими моделями для изучения формирования иммунитета против возбудителя туляремии служили иммунизированные ЖТВ (подкожно, в дозе 2x10⁶ м. кл.) морские свинки. Интактных животных использовали для отрицательного контроля.

Для оценки клеточного иммунитета у вакцинированных людей и морских свинок применяли реакцию лейкоцитолита (РЛ), а на модели морских свинок осуществляли также постановку внутрикожной туляриновой пробы. Обе реакции выполняли согласно [4]. В качестве антигенов в этих реакциях использовали: коммерческий препарат тулярина (Омск, Институт природно-очаговых инфекций); экспериментально полученные тулярин⁺ и тулярин⁻; убитые кипячением бактерии *F. tularensis* 15; очищенные препараты S-ЛПС и R-ЛПС из природных вирулентных и изогенных ЛПС-дефектных авирулентных штаммов *F. tularensis*; полисахаридную фракцию S-ЛПС, взвесь бактерий *Escherichia coli* (10¹⁰ м. кл./мл), прогретую при 70°C 1 час (контроль специфичности реакции). При постановке РЛ убитые бактериальные суспензии добавляли в лунки в дозах, регламентированных в [4] (50 мкл из 10¹⁰ м. кл./мл), дозы препаратов ЛПС составляли 25 мкг на лунку, а полисахаридную фракцию S-ЛПС добавляли в количестве 2,5 мкг на лунку. Коэффициент лейкоцитолита (КЛ) рассчитывали по известной формуле. Результаты интерпретировали следующим образом: КЛ ≤ 15% — отрицательный результат; КЛ = 15 — 20% — слабоположительный или сомнительный результат; КЛ ≥ 20% — положительный результат.

Для проведения кожной аллергической пробы у животных предварительно выбривали шерсть на брюшном участке кожи. Через сутки внутрикожно вводили исследуемые антигенные препараты (в объеме 0,2 мл) в следующих дозах: убитые бактериальные суспензии 10⁸ м.кл./свинку, препараты ЛПС 100 мкг/свинку, полисахаридная фракция S-ЛПС 10 мкг/свинку. Результаты оценивали через 24 — 48 часов по наличию покраснения и отека в месте введения антигена.

Специфические противотуляремийные антитела в исследуемых сыворотках людей и животных определяли с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с коммерческим эритроцитарным диагностикумом (ЗАО «Финист», НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, Москва). Для контроля специфичности выявленных антител проводили реакцию торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА). Все реакции ставили микрометодом согласно [4].

Забор крови от морских свинок осуществляли после хлороформирования через 5, 14, 21 и 40 дней после иммунизации. Одну порцию крови от животных использовали для РЛ, а другую — для получения сывороток и дальнейшей постановки серологических реакций. В эти же сроки проводили аллергические пробы на иммунных животных.

Наличие протективного эффекта иммунизации ЖТВ оценивали с помощью заражения иммунных животных вирулентным штаммом *F.tularensis* 503 (subsp. *holarctica*) в дозе 1000 DCL в различные сроки после введения вакцины. Количество вакцинированных животных, выживших после заражения вирулентным штаммом, сравнивали с контрольной неиммунной группой.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка показателей гуморального (титры специфических антител) и клеточного звеньев иммунитета у вакцинированных ЖТВ людей показало, что через 21 — 60 дней после иммунизации в организме происходит формирование противотуляремийного иммунитета. В частности, в крови у всех обследованных людей в РНГА были обнаружены специфические противотуляремийные антитела в титрах 1:80 — 1:2560 и в $85 \pm 3,3\%$ проб — положительные значения коэффициента лейкоцитоза с коммерческим тулярином (табл. 1).

Изучение динамики развития иммунного ответа у морских свинок выявило, что их вакцинация индуцирует активное антителообразование. Так, к 14 дню после введения вакцины в РНГА зарегистрированы титры 1/20 — 1/160, а к 21 дню значения титров достигали максимума — 1/640 — 1/2560. В то же время, sensibilized лейкоциты появлялись в крови экспериментальных морских свинок в более ранние сроки после вакцинации. Например, уже через 5 дней у $90 \pm 6,7\%$ вакцинированных животных была установлена положительная реакция лейкоцитоза, при этом количество животных с положительным КЛ оставалось высоким (90 — 100%) в течение всего срока наблюдения (40 дней). Развитие клеточного иммунитета у привитых животных подтверждалось также и при постановке аллергических проб (к 5 дню) — $20 \pm 2\%$, а к 21 дню 100% свинок давали выраженную реакцию на внутрикожное введение тулярина. Более того, как оказалось, уже через 5 дней после иммунизации $60 \pm 3,3\%$ животных были устойчивы к летальной дозе заражения вирулентным штаммом *F. tularensis*. На более поздних сроках вакцинального процесса (21 день), когда показатели иммунитета достигали максимальных значений, эффективность защиты возрастала до $90 \pm 6,7\%$. Следовательно, вакцинация морских свинок ЖТВ приводит к активации гуморального и клеточного механизмов защиты, обеспечивая высокую устойчивость животных к возбудителю туляремии. Показано также, что появление положитель-

Таблица 1. Показатели клеточного, гуморального и протективного иммунитета после вакцинации морских свинок и людей живой туляремийной вакциной

| Вакцинированные | Дни после вакцинации | % проб с положительной РЛ (КЛ \geq 20%) | % животных с положительной аллергической пробой с тулярином | Титр антител в РНГА | % выживших иммунных животных после заражения вирулентным штаммом |
|-----------------|----------------------|---|---|---------------------|--|
| Морские свинки* | 5 | $90 \pm 6,7$ | 20 ± 2 | 0 | $60 \pm 3,3$ |
| | 14 | $95 \pm 3,3$ | $50 \pm 6,7$ | 1/20—1/160 | $60 \pm 3,3$ |
| | 21 | 100 | 100 | 1/640—1/2560 | $90 \pm 6,7$ |
| | 40 | 100 | — | 1/320—1/640 | — |
| Люди** | 21—60 | $85 \pm 3,3$ | — | 1/80—1/2560 | — |

Примечание. Представлены средние значения трех независимых определений с указанием среднего линейного отклонения (здесь и в табл. 2); иммунных животных заражали подкожно вирулентным штаммом голарктического подвида *F. tularensis* 503 в дозе 1000 DCL; * по 10 животных в группе; ** 50 человек; — не определяли.

ных показателей клеточного иммунитета хозяина происходит быстрее по сравнению с гуморальным звеном.

На следующем этапе работы с целью выяснения роли различных антигенов, включая ЛПС, в индукции аллергической реакции нами были получены высокоочищенные от белковых примесей препараты — S-ЛПС из вирулентного и R-ЛПС из изогенного авирулентного штаммов *F.tularensis* [7]. Кроме того, изучена иммуностимулирующая активность O-полисахаридной фракции S-ЛПС. В сравнительное исследование были включены также: коммерческий тулярин; экспериментальные тулярин⁺ и тулярин⁻ (убитые при 70°C бактерии исходного штамма *F. tularensis* 15, имеющего S-ЛПС, и изогенного капсулодефицитного мутанта *F. tularensis* 15 cap⁻, синтезирующего R-ЛПС); бактериальные суспензии исходного вакцинного штамма *F. tularensis* 15, прогретые в денатурирующих белок условиях (100°C).

Исследование крови вакцинированных людей с помощью РЛ при использовании перечисленных антигенных препаратов показало, что наиболее выраженная реакция аллергии регистрируется с коммерческим и экспериментальным тулярином⁺ (90±2 и 93±2,7%, соответственно) (табл. 2). В противоположность этому, тулярин⁻ на основе R-штамма или очищенный препарат S-ЛПС вызывали лизис иммунных лейкоцитов в достоверно более низком количестве случаев (44±2,7 и 15±1,3%, соответственно). O-полисахаридная фракция S-ЛПС, R-ЛПС и убитые кипячением бактерии оказались инертными. Специфичность результатов подтверждена отрицательными значениями коэффициента лейкоцитолита с прогретой при 70°C взвесью гетерогенных микробов (*E.coli*).

Подобная закономерность продемонстрирована и в экспериментах с образцами крови иммунизированных против туляремии морских свинок. Так, положительный коэффициент лейкоцитолита был зарегистрирован в 97±2% случаев с коммерческим тулярином или с тулярином⁺. В то же время, тулярин⁻ лизировал сенсibilизированные лейкоциты в 26±4% изученных проб. Препараты ЛПС, полисахаридная фракция или кипяченые бактерии достоверно снижали или полностью утратили способность вызывать повреждение лейкоцитов.

Результаты экспериментов *in vivo* с использованием морских свинок подтвердили, что внутрикожное введение только коммерческого или экспериментального тулярина⁺ вызывало четко регистрируемую положительную кожную аллергическую реакцию у 95±3,3% иммунных животных. Кожные проявления на введение других антигенов либо отсутствовали, либо обнаруживались лишь в незначительном количестве случаев (тулярин⁻ — 28±2%, S-LPS — 20±2%).

Таким образом, проведенное исследование показало, что только целые клетки *F.tularensis*, убитые в неденатурирующих белок условиях и сохраняющие полноценную структуру S-ЛПС (тулярин⁺), являются активными индукторами ГЗТ.

Таблица 2. Показатели реакции лейкоцитолита и аллергической пробы с различными антигенами туляремийного микроба после вакцинации морских свинок и людей живой туляремийной вакциной

| Вакцинированные | Тест | % положительных реакций | | | | | | |
|------------------|--------------|---|----------------------|----------------------|--------|--------|-------------|--------------------|
| | | Антигены, используемые для постановки теста | | | | | | |
| | | коммерческий тулярин | тулярин ⁺ | тулярин ⁻ | S-ЛПС | R-ЛПС | полисахарид | кипяченые бактерии |
| Люди* | РЛ | 90±2 | 93±2,7 | 44±2,7 | 15±1,3 | 0 | 0 | 0 |
| Морские свинки** | РЛ | 97±2 | 97±2 | 26±4 | 0 | 11±1,3 | 0 | 0 |
| | Кожная проба | 95±3,3 | 95±3,3 | 28±2 | 20±2 | 8±2 | 0 | 0 |

Примечание. * Кровь для исследования от людей брали в различные сроки после вакцинации (всего 50 человек); ** морских свинок исследовали через 5 — 40 дней после вакцинации ЖТВ (по 10 свинок в группе).

Нарушения структуры ЛПС (тулярин^г) приводят к достоверному снижению, а денатурация бактериальных белков (при кипячении) вызывает полную утрату иммуностимулирующих свойств препаратов. Очищенные препараты ЛПС и О-полисахаридная фракция S-ЛПС не способны эффективно активировать клеточное звено иммунитета. Анализ полученных данных предполагает, что индукция полноценного противотуляремийного иммунитета определяется сложным взаимодействием гуморального и клеточного звеньев, причем ЛПС является не только мощным активатором В-клеточного иммунитета, но и, по-видимому, участвует в наиболее эффективном представлении иммуногенов белковой природы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что возбудители внутриклеточных инфекций, таких как туляремия, бруцеллез, туберкулез, вызывают алергизацию организма хозяина с формированием гиперчувствительности замедленного типа. В основе этого процесса лежит активация клеточного звена иммунитета и накопление антигенспецифических Т-лимфоцитов, которые при вторичном контакте с антигеном обеспечивают быстрый и эффективный иммунный ответ. На регистрации реакции ГЗТ после антигенной стимуляции в настоящее время основана диагностика многих инфекций. Кроме того, степень выраженности аллергического ответа позволяет судить о напряженности клеточного постинфекционного (или поствакцинального) иммунитета. С этой целью широко используют различные аллергические тесты: *in vivo* — кожная аллергическая проба, *in vitro* — реакции бласттрансформации или пролиферации лейкоцитов, лимфоцит-стимулирующий тест, реакция торможения миграции лейкоцитов, реакция лейкоцитолитиза и др. На модели *F. tularensis* LVS, а также мутантных вариантов LVS со сниженной иммуногенностью продемонстрирована прямая корреляция между степенью активации Т-лимфоцитов и эффективностью противотуляремийного иммунитета [13].

Поскольку ГЗТ — высокоспецифичная реакция, то изучение различных бактериальных препаратов при постановке алерготестов может выявить антигены, ответственные за сенсibilизацию Т-лимфоцитов и, следовательно, за защиту от инфекции. Большинство работ, посвященных этой теме, доказывают, что у туляремийного микроба такими антигенами являются различные белки [19 — 21]. В то же время, в отношении участия ЛПС в стимуляции алергии сведения фрагментарны и противоречивы.

Целью нашего исследования явилось выяснение роли ЛПС в индукции реакции алергии, то есть клеточного звена противотуляремийного иммунитета. Для этого были получены препараты S- и R-ЛПС с помощью детергентного метода, который позволяет эффективно избавляться даже от SDS-резистентных белков и получать высокоочищенные препараты (менее 0,1% белка) разных хемотипов в идентичных условиях [12]. Последнее дает возможность провести корректное сравнение биологических свойств препаратов с полноценной (S-ЛПС) и дефектной (R-ЛПС) структурами. Исследование очищенных препаратов S- и R-ЛПС *F. tularensis* в алергических тестах *in vivo* на модели морских свинок и *in vitro* в РЛ с образцами крови иммунных людей и животных выявило их крайне низкую активность по сравнению со стандартным препаратом тулярина. Показано также, что убитые кипячением бактерии *F. tularensis* и полисахаридная фракция S-ЛПС лишены способности вызывать лизис иммунных лейкоцитов или кожную алергическую реакцию. Результаты наших экспериментов согласуются с данными Surcel H.M. et al. [21], которые показали, что препараты S- и R-ЛПС *F. tularensis*, полученные двумя разными методами, не проявляют активности в тесте бласттрансформации лимфоцитов. С другой стороны, согласно работам некоторых авторов [5, 10], препараты ЛПС туляремийного микроба, напротив, обладают высокой активностью (сопоставимой с коммерческим тулярином) в реакции

бласттрансформации, а также в реакции лейкоцитолита и кожной аллергической пробе. Подобное противоречие может быть обусловлено разницей в методах получения препаратов ЛПС и, особенно, степени их очистки от белковых примесей.

Анализ полученных нами результатов подтверждает мнение большинства исследователей о доминирующей роли белков туляремийного микроба в активации клеточного иммунитета. Вместе с тем, в процессе настоящего исследования получены факты, не позволяющие однозначно исключить косвенное участие ЛПС в реакции аллергии. В частности, тулярин⁻, представленный бактериями ЛПС-дефектного штамма *F.tularensis* cap⁻, имеет одинаковый с родительским штаммом (тулярин⁺) состав белковых антигенов, но отличается структурой ЛПС (R-ЛПС). Тем не менее, активность тулярина⁻ в проведенных аллергических реакциях была в 2 — 3 раза ниже, чем у тулярина⁺. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что наличие ЛПС с полноценной структурой влияет на иммуностимулирующие свойства антигенных препаратов *F.tularensis*. Механизмы такого влияния требуют дальнейшего углубленного изучения. Учитывая тот факт, что ЛПС относят к тимуснезависимым антигенам, его участие в сенсibilизации Т-клеток, по-видимому, является опосредованным. Нельзя исключить, что ЛПС *F.tularensis* выступает в качестве адьюванта и обеспечивает наиболее эффективное представление эпитопов белковых молекул для взаимодействия с рецепторами Т-лимфоцитов. В пользу этого свидетельствуют данные Rahhal R.M. et al. [17] о возможности ЛПС *F.tularensis* через активацию В-лимфоцитов, сопровождающуюся продукцией провоспалительных цитокинов, активировать другие иммунокомпетентные клетки периферической крови.

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют в пользу того, что ЛПС совместно с белковыми антигенами является важным компонентом бактериальной клетки, участвующим в индукции протективного иммунитета против туляремии. В то же время, очищенные препараты ЛПС не способны активировать гуморальное или клеточное звенья специфического иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волох О.А., Кузнецова Е.М., Смолькова Е.А., Шуковская Т.Н., Бугоркова С.А., Авдеева Н.Г., Филимонова Д.Г., Шмелькова Т.П., Ключева С.Н., Никифоров А.К. Экспериментальный препарат для специфической профилактики туляремии. Проблемы ООИ. 2013, 2: 73-77.
2. Волох О.А., Шепелев И.А., Фирстова В.В., Храмова Е.М., Авдеева Н.Г., Самохвалова С.А., Еремин С.А., Дятлов И.А., Жемчугов В.Е. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса возбудителя туляремии как перспективного компонента химических вакцин. Журн. микробиол. 2007, 3: 16-21.
3. Кузнецова Е.М., Шепелев И.А., Волох О.А. Структурно-функциональная характеристика основных антигенов *Francisella tularensis*. Проблемы ООИ. 2009, 100: 44-48.
4. МУ 3.1.2007-05. Эпидемиологический надзор за туляремией: Методические указания. М., Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2005.
5. Николаев В.Б. Физико-химические и иммунобиологические свойства антигенов туляремийного микроба: Автореф. дис. канд. мед. наук. Иркутск, 2005.
6. Оноприенко Н.Н. Сравнительная характеристика липополисахаридов бактерий рода *Francisella*. Автореф. дис. канд. биол. наук. Саратов, 2001.
7. Оноприенко Н.Н., Павлович Н.В. Роль липополисахарида в токсичности бактерий рода *Francisella*. Мол. генетика, микробиол. и вирусол. 2003, 3: 25-28.
8. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis*. Антибиотики и мед. биотехнол. 1987, 32 (2): 133-137.
9. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н., Данилевская Г.И. и др. Получение бескапсульных вариантов *Francisella tularensis*. Журн. микробиол. 1993, 2:7-11.
10. Савельева Р.А., Ананова Е.В., Пронин А.В. и др. Определение продолжительности поствакцинального иммунитета против туляремии. Журн. микробиол. 1995, 6: 51-52.
11. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В., Сорокин В.М., Тынкевич Н.К. Способность

- авирулентных форм *Francisella tularensis* к диссеминации и пролиферации в организме хозяина. Журн. икробиол. 1996, 2: 10-13.
12. Darveau R.P., Hancock R.E.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. J. Bacteriol. 1983, 155 (2): 831-838.
 13. De Pascalis R., Chou A.Y., Bosio C.M. et al. Development of functional and molecular correlates of vaccine-induced protection for a model intracellular pathogen, *F. tularensis* LVS. PLoS Pathog. 2012, 8 (1):1-14.
 14. Isherwood K.E., Titball R.W., Davies D.H. et al. Vaccination strategies for *Francisella tularensis*. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2005, 57 (9): 1403-1414.
 15. Khlebnikov V.S., Golovliov I., Kulevatsky D.P. et al. Outer membranes of lipopolysaccharide-protein complex (LPS-17 kDa protein) as chemical tularemia vaccines. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996, 13: 227-235.
 16. Oyston P.C., Griffiths R. *Francisella* virulence: significant advances, ongoing challenges and unmet needs. Expert. Rev. Vaccines. 2009, 8 (11): 1575-1585.
 17. Rahhal R.M., Vanden Bush T.J., McLendon M.K. et al. Differential effects of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide on B lymphocytes. J. Leukoc. Biol. 2007, 82: 813-820.
 18. Richard K., Mann B. J., Stocker L. et al. Novel cationic surfactant vesicle vaccines protect against *Francisella tularensis* LVS and confer significant partial protection against *F. tularensis* Schu S4 strain. Clin. Vac. Immunol. 2014, 21 (2): 212-226.
 19. Sandström G., Tärnvik A., Wolf-Watz H. Immunospecific T-lymphocyte stimulation by membrane proteins from *Francisella tularensis*. J. Clin. Microbiol. 1987, 25 (4): 641-644.
 20. Sjöstedt A., Sandström G., Tärnvik A. Several membrane polypeptides of the live vaccine strain *Francisella tularensis* LVS stimulate T cells from naturally infected individuals. J. Clin. Microbiol. 1990, 28 (1): 43-48.
 21. Surcel H.M., Sarvas M., Helander I.M., Herva E. Membrane proteins of *Francisella tularensis* LVS differ in ability to induce proliferation of lymphocytes from tularemia-vaccinated individuals. Microb. Pathog. 1989, 7 (6): 411-419.
 22. Tärnvik A. Nature of protective immunity to *Francisella tularensis*. Rev. Infect. Dis. 1989, 11 (3): 440-451.

Поступила 20.04.15

Контактная информация: Оноприенко Наталья Николаевна, к.б.н., 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863)240-27-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Д.В.Ульшина, Д.А.Ковалев, А.М.Жиров, Н.В.Жаринова, А.А.Худолеев, О.И.Коготкова, В.И.Ефременко, Н.И.Евченко, А.Н.Куличенко

ОСОБЕННОСТИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ ПРОФИЛЕЙ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА ПРИ ПОДГОТОВКЕ КУЛЬТУРЫ НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Ставропольский противочумный институт

Цель. С помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) провести сравнительный анализ белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза (*Brucella melitensis* Rev-1 и *Brucella abortus* 19ВА), выращенных на разных питательных средах: агар Альбими, бруцеллагар и эритрит-агар. *Материалы и методы.* Вакцинные штаммы: *Brucella melitensis* Rev-1 и *Brucella abortus* 19ВА. Белковое профилирование в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex «Bruker Daltonics». *Результаты.* Выявлен ряд характерных особенностей масс-спектров бруцелл: в частности, сохранение общего качественного состава белковых профилей культур и значительные различия в интенсивности отдельных пиков в зависимости от используемой питательной среды. *Заключение.* На основе анализа полученных данных показано, что применение агара Альбими в качестве питательной среды при подготовке образцов культур бруцелл для масс-спектрометрического анализа является оптимальным.