

**Горбатов Алексей Александрович**

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕНОВ *FRANCISELLA SSP.*, ПЕРСПЕКТИВНЫХ  
ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ТУЛЯРЕМИИ**

**03.02.03 - Микробиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Оболенск – 2019**

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научные руководители:**

доктор биологических наук

**Фирстова Виктория Валерьевна**

кандидат биологических наук

**Бикетов Сергей Федорович**

**Официальные оппоненты:**

**Саяпина Лидия Васильевна** - доктор медицинских наук, главный эксперт Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, управление экспертизы противобактериальных иммунобиологических препаратов, старший научный сотрудник

**Щуковская Татьяна Николаевна** - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д. 208.046.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10 и на сайте: <http://www.gabrich.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, доцент

**Борисова Ольга Юрьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция, вызываемая грамотрицательной коккобактерией *Francisella tularensis*. Согласно современным представлениям, этот микроорганизм принадлежит к семейству *Francisellaceae* к роду *Francisella* (Brenner D.J. et al., 2005). Ранее к роду *Francisella* относили два вида: *Francisella tularensis* и *Francisella philomiragia*. В настоящее время род включает и другие виды: *F. haliotica*, *F. hispaniensis*, *F. marina*, *F. noatunensis*, *F. persica* (Taxonomy Browser, 2019). По принятой в настоящее время международной классификации в пределах вида *F. tularensis* выделяют четыре подвида: *tularensis* (то же, что и *nearctica*) – тип А, распространенный в Северной Америке, *holarctica* (то же, что и *palaeartica*) – тип В, встречающийся в основном в Азии и Европе; *mediasiatica*, ранее считающийся распространенным только на территории Средней Азии, но недавно обнаруженный на Алтае (Мокриевич А. и др., 2013; Timofeev V. et al., 2017), и *novicida*. Наибольшей вирулентностью для человека обладает североамериканский подвид *tularensis* (Олсуфьев Н. и др., 1960). Штаммы подвида *holarctica* являются менее вирулентными. Степень вирулентности подвида *mediasiatica* некоторыми авторами приравнивается к *novicida* (Thomas R.M. et al., 2007). *F. tularensis* subsp. *novicida* считают условно патогенной для человека – единичные случаи выделения этого подвида от людей касались только лиц со сниженным иммунным статусом (Leelaporn A. et al., 2008).

Высокая восприимчивость для человека и значительная летальность (26,8%) (Бачинский А.Г. и др., 2015) при отсутствии мер противодействия является причиной отнесения туляремии к особо опасным инфекциям и потенциальным агентам биологического оружия (Porsch-Ozcurumez M. et al., 2004; Oyston P.C.F. et al., 2004; Maurin M. 2015).

Подтверждение диагноза туляремии может быть проведено различными методами: путем выделения чистой культуры возбудителя из клинических образцов, молекулярно-генетическими методами с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также при помощи серологических методов, выявляющих наличие специфических антител к возбудителю туляремии в сыворотках пациентов (Tärnvik A. et al., 2007; Hepburn M.J. et al., 2008). Успешное выделение культуры из крови пациентов с бактериемией, как правило, имеет место не более, чем у 10 % пациентов (Karağöz S. et al., 2013). Зачастую это связано с тем, что клинические образцы получают уже после проведения антибактериальной терапии. В некоторых случаях результаты ПЦР-анализа позволяют обнаружить ДНК возбудителя в отделяемом кожных язв, в конъюнктивальных или глоточных экссудатах, и могут служить доказательством для подтверждения диагноза туляремии (Tärnvik A. et al., 2007; Hepburn M.J. et al., 2008). Отсутствие в большинстве медицинских учреждений специализированных ПЦР-лабораторий, имеющих разрешение на проведение работ с бактериальными агентами I-II групп биологической опасности, к которым относится данный возбудитель (Shapiro D.S. et al., 2002), а также сложность выделения чистой культуры тулярийного микроба лежат в основе того, что постановка диагноза туляремии чаще всего основывается на результатах серологических анализов.

В настоящее время для лабораторного подтверждения клинического диагноза туляремии, согласно методическим указаниям (МУ 3.12007-05), предписывается использовать целый ряд иммунологических исследований: кожная проба с тулярином, реакция лейкоцитолита, реакция непрямой гемагглютинации, реакция агглютинации, метод флуоресцирующих антител, иммуноферментный анализ, реакция нейтрализации антител (МУ 3.12007-05; Сырова Н.А. и др., 2008). Данные методы для получения результатов требуют наличия специализированного оборудования и занимают от 3 до 18

часов. В РФ для выявления антитуляреминых антител доступен только один зарегистрированный коммерческий туляреминый серодиагностикум - "РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ" (производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института), однако агглютинационные методы недостаточно чувствительны и могут давать ложноположительные результаты при исследовании сывороток больных некоторыми другими инфекциями, в частности, бруцеллезом (Behan K.A. et al., 1982; Bevanger L. et al., 1988; Schmitt P. et al., 2005).

Все это обуславливает актуальность совершенствования серологических методов для диагностики туляремии, необходимых как для постановки предварительного диагноза, так и для оценки напряженности поствакцинального иммунитета и проведения эпидемиологического мониторинга в эндемичных районах.

### **Степень разработанности темы исследования**

На сегодняшний день для серологических исследований в качестве антигенов для обнаружения специфических антител к возбудителю туляремии применяют взвесь инаktivированных микробных клеток или очищенный препарат липополисахарида (Porsch-Ozcurumez M. et al., 2004; Splettstoesser W. et al., 2005; Сырова Н.А. и др., 2008; Kilic S. et al., 2012; Celebi B. et al., 2013; Sharma N. et al., 2013; Chaignat V. et al., 2014).

С начала прошлого века в реакциях агглютинации, используемых для серодиагностики, в качестве антигена используются инаktivированные микробные клетки (Хатеневер Л.М. и др., 1934; Massey E.D. et al., 1974; Brown S.L. et al., 1980; Bevanger L. et al., 1988; Сырова Н.А. и др., 2008). Для повышения чувствительности их связывают с формализированными эритроцитами (Шмутер М.Ф. и др., 1978; Шамардин В.А. и др., 1978), латексом (Rastawicki W. et al., 2015) или инаktivированные микробные клетки непосредственно окрашивают различными красителями (нитросиним тетразолиумом, сафронином) (Jones W.L. et al., 1980; Celebi B. et al., 2013). Такие тест-системы до сих пор находят свое применение в диагностических лабораториях в различных странах, в том числе в РФ (Сырова Н.А. и др., 2008; Eliasson H. et al., 2008; Wang Y.H. et al., 2015).

В последнее время наиболее распространенными форматами серологических тестов для обнаружения специфических антитуляреминых антител в сыворотках крови человека и животных являются иммуноферментный (ИФА) и иммунохроматографический (ИХ) анализы, показавшие себя достаточно эффективными. Однако следует отметить, что в большинстве работ для детекции антител используются экспериментальные серии тест-систем. Только небольшое количество тест-систем имеет статус коммерческих: две ИФА тест-системы - «ELISA classic *Francisella tularensis* IgG/IgM» (SERION, Германия), «Anti-*Francisella tularensis* ELISA» (Serazym ELISA) (Seramun Diagnostica, Германия) для детекции всех классов антител, и один ИХ-тест - «VIRapid» (Santa Fé, Испания) (Kilic S. et al., 2012; Chaignat V. et al., 2014). В этих тестах в качестве антигена используют очищенный липополисахарид *F. tularensis*.

Выявление антитуляреминых сывороточных антител служит не только для установления диагноза у больного или переболевшего, но и для оценки иммунологического статуса привитых (Splettstoesser W. et al., 2005; Никифоров В. и др., 2007; МУ 3.1.2007-05). В ситуации, когда часть населения, проживающего в эндемичных по туляремии районах, вакцинирована и имеет определенный уровень специфических антител, при интерпретации данных серологических исследований у больных и переболевших пациентов могут возникнуть трудности. Ароновой Н.В. с сопр. (2005) было показано, что специфические антитела, появляющиеся в сыворотке крови у людей, переболевших туляремией, и у кроликов, зараженных вирулентными штаммами, способны связываться как с липополисахаридом *F. tularensis*, так и с липополисахаридом

*F. novicida*, в то время как при вакцинации специфические антитела к липополисахариду *F. novicida* отсутствуют.

В последние годы с помощью протеомного анализа и технологии микроэлектронной масс-спектрометрии ведется поиск белковых антигенов, которые могут иметь иммунодиагностическое значение для оценки гуморального иммунного ответа (Janovska S. et al., 2007a, 2007b; Nakajima R. et al., 2016). В качестве иммунодоминантных антигенов рассматривается целый ряд белков, среди которых белки FTT0077, FTT0106, FTT1696, FTT0472 и FTT0975 (Романова Л.В. и др., 1997; Janovska S. et al., 2007a, 2007b; Nakajima R. et al., 2016).

Если в практическом здравоохранении в РФ используются только два теста для оценки клеточного звена иммунитета – кожная проба с тулярином и реакция лейкоцитоллиза, то в зарубежной практике уже используется тест *in vitro*, основанный на определении уровня индуцированного спленоцитами синтеза интерферона-гамма в ответ на комплексный туляремийный антиген (Porsch-Ozcurumez M. et al., 2004; Chaignat V. et al., 2014). До настоящего времени выбор отдельных антигенов или их комплексов, перспективных для использования при оценке клеточных иммунных реакций, не проведен.

Очевидно, что применяемые в практическом здравоохранении в РФ тест-системы для серодиагностики туляремии требуют совершенствования для соответствия уровню современных тест-систем, используемых за рубежом. При разработке новых эффективных тестов для ускоренной серодиагностики туляремии приоритетными направлениями являются поиск и изучение диагностического потенциала высокоспецифичных антигенов *F. tularensis* и/или их композиций.

#### **Цель исследования**

Изучить диагностический потенциал антигенов бактерий *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida* и разработать на их основе иммунохроматографические тесты для ускоренной серодиагностики туляремии.

#### **Задачи исследования:**

1. Провести информационно-аналитический обзор об иммунологически активных белковых антигенах *Francisella ssp.*
2. С использованием коллекции сывороток, с помощью иммуноблотта выбрать наиболее иммунореактивный белковый антиген, получить его в виде рекомбинантного белка и определить серодиагностический потенциал.
3. Изучить диагностическую ценность липополисахарида *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* с учетом особенностей его химической структуры. Оценить возможность использования липополисахаридов *F. tularensis* (ЛПС Ft) и *F. novicida* (ЛПС Fn) для дифференциации иммунного ответа вакцинированных и переболевших людей.
4. Изучить диагностическую значимость антигенных препаратов *F. tularensis* для оценки клеточного иммунитета на мышинной модели туляремии.
5. Получить набор сывороток крови от различных видов животных, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*, для изучения перспектив использования антигенов FTT1696, ЛПС Ft и ЛПС Fn для серодиагностики туляремии.
6. Создать экспериментальные образцы иммунохроматографических тестов для серодиагностики туляремии на основе полученных антигенов.
7. С использованием коллекции сывороток крови людей и животных после иммунизации и/или заражения штаммами *F. tularensis* провести сравнительную оценку

диагностической чувствительности и специфичности экспериментальных образцов ИХ-тестов с доступными коммерческими серодиагностикумами.

#### **Научная новизна**

Впервые создан штамм-продуцент *E. coli* BL21\pETFTT1696 для экспрессии рекомбинантного белка FTT1696 *F. tularensis*, клонированного в составе вектора pET32b (Novagen USA).

Впервые установлена специфичность белкового антигена FTT1696 для штаммов *F. tularensis* разных подвидов и показана его диагностическая значимость, что позволяет использовать рекомбинантный белок FTT1696 с целью создания иммунохроматографических тестов для серодиагностики туляремии.

Получены новые данные о том, что соотношение гидрофильной и гидрофобной частей в препаратах ЛПС штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* коррелирует с толщиной капсульного вещества для штамма каждого подвида, определяемой методом электронной микроскопии.

Получены убедительные доказательства на статистически значимом количестве экспериментальных животных (морские свинки, кролики и крысы), что использование иммунологических тестов на основе липополисахаридов *F. tularensis* и *F. novicida* позволяет дифференцировать гуморальный ответ между вакцинированными и переболевшими.

Выявлено, что при экспериментальной туляремии у мышей линии BALB/c, в отличие от других лабораторных животных (морских свинок, кроликов и крыс), формируется иной тип гуморального иммунного ответа, выражающийся в сниженном уровне титров специфических антител к липополисахариду *F. tularensis* и в отсутствии антител к липополисахариду *F. novicida*.

Впервые показано, что совместное использование трех антигенов: липополисахарида *F. tularensis*, липополисахарида *F. novicida* и рекомбинантного белка FTT1696 в составе иммунохроматографических тестов повышает чувствительность и специфичность серодиагностики.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Предложена научная гипотеза, объясняющая феномен серопозитивности сывороток людей и животных, инфицированных вирулентными штаммами *F. tularensis*, в отношении липополисахарида *F. novicida*, отсутствующей в сыворотках вакцинированных. Вероятно, инфицирование вирулентными штаммами, характеризующимися большим количеством капсульного О-антигена по сравнению с вакцинным штаммом, приводит к индукции антител, распознающих общие для подвидов *F. tularensis* и *F. novicida* эпитопы в О-антигенной части соответствующих липополисахаридов.

Показана целесообразность использования комплексных антигенов туляремийного микроба – тулярина, ультразвукового дезинтеграта и кислотонерастворимого комплекса – в качестве специфических индукторов иммунокомпетентных клеток для оценки напряженности клеточного иммунитета.

Выявлены существенные отличия параметров гуморального иммунного ответа у мышей линии BALB/c при экспериментальной туляремии по сравнению с лабораторными животными других видов.

Определена значимость использования рекомбинантного белка FTT1696 в качестве дополнительного антигена для серодиагностики туляремии.

Показана возможность комплексного использования очищенных препаратов антигенов ЛПС *F. tularensis*, *F. novicida* и рекомбинантного белка FTT1696 для серодиагностики туляремии.

В «Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов-Оболенск» депонирован высокопродуктивный штамм-продуцент *E.coli* BL21/pETFTT1696 для экспрессии рекомбинатного белка FTT1696 (справка № В8363 от 29.01.2018 г.).

Разработаны и апробированы универсальные иммунохроматографические тест-системы на основе наночастиц золота, конъюгированных с белком G, для обнаружения специфических антител к туляреминому микробу с тремя антигенами – туляремиными липополисахаридами *F. tularensis*, *F. novicida* и рекомбинантным белком FTT1696 – для комплексной серодиагностики туляремии у людей и животных.

Созданы, утверждены на учрежденческом уровне и внедрены в практическую работу лабораторий следующие методические рекомендации: «Оценка напряженности специфического клеточного иммунитета у людей к возбудителю туляремии *in vitro*» (одобренны Ученым советом Федерального бюджетного учреждения науки государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии и утверждены директором, протокол Ученого совета № 8 от 07.10.2011 г.), «Методика оценки напряженности специфического иммунитета к туляремии на мышинной модели при иммунизации потенциальными вакцинными штаммами» (одобренны Ученым советом Федерального бюджетного учреждения науки государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии и утверждены директором, протокол Ученого совета № 8 от 29.10.2015 г.). Создано практическое пособие «Методы изучения возбудителя туляремии» (Под ред. академика РАН И.А.Дятлова. Авторы: А.Н. Мокриевич, Т.Б. Кравченко, Г.М. Титарева, И.В. Бахтеева, Г.М. Вахрамеева, А.А. Горбатов, И.А. Дятлов, Т.И. Комбарова, П.Х. Копылов, Т.Ю. Кудрявцева, Л.И. Маринин, Р.И. Миронова, А.Н. Сомов, В.С. Тимофеев, Е.А. Тюрин, В.В. Фирстова, Р.З. Шайхутдинова, Н.А. Шишкова. - Оболенск.: ФБУН ГНЦ ПМБ, 2018).

Результаты исследования используются в работе в Центре индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности при Федеральном бюджетном учреждении науки государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии – для исследования сывороток вакцинированных и переболевших туляремией людей, а также сывороток экспериментальных животных для выявления специфических антител к возбудителю туляремии (акт внедрения от 17.01.2018). Материалы диссертации используются в работе испытательного лабораторного центра противочумной станции в Федеральном государственном учреждении здравоохранения «Медико-санитарная часть № 164» с целью выявления специфических антител к возбудителю туляремии у вакцинированных сотрудников Федерального бюджетного учреждения науки государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, что позволяет повысить достоверность диагностических исследований в случаях отрицательных и сомнительных результатов при тестировании сывороток традиционным методом реакции непрямой гемагглютинации (акт внедрения от 14.02.2018). Результаты исследования используются в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте при выявлении противотуляреминых антител в сыворотках вакцинированных людей при дополнительных диагностических исследованиях, а также в отделе профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов в программах обучения (акт внедрения от 10.02.2018).

### **Методология и методы исследования**

Методология настоящего исследования спланирована, исходя из современных принципов научного познания, и организована адекватно поставленной цели. Предметом исследования является *F. tularensis*, совершенствование лабораторной серодиагностики туляремии. Анализ научной литературы, посвященной проблеме серодиагно-

стики, проведен на основе формально-логических методов исследования. Планирование и проведение исследований осуществляли на основе общенаучных и специфических методов.

Основными объектами исследования являлись липополисахарид, выделенный из бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*), рекомбинантный белок FTT1696, являющийся аналогом цитоплазматического белка-шаперона I типа возбудителя туляремии, и сыворотки больных и вакцинированных людей, иммунизированных и зараженных лабораторных животных. В работе применяли микробиологические, молекулярно-генетические, биохимические и иммунологические методы исследований. Результаты анализировали при помощи статистических методов. Работы на животных проводились в соответствии с нормами биоэтики в соответствии ветеринарным протоколом № ВП-2017/2А от 20.06.2017.

В основу дизайна исследования положены три подхода. Первый из них – это изучение антигенов *F. tularensis* различных подвидов; второй – определение их иммунодиагностической значимости; третий – разработка и апробация иммунохроматографических тестов для серодиагностики туляремии.

#### **Штаммы микроорганизмов, экспериментальные животные**

В работе использовали 17 штаммов *F. tularensis* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск».

Моделирование инфекции проводили на мышах линии BALB/c(H2<sup>d</sup>), (6-8 недель, масса 18-20 г), крысах линии Wistar (5-7 недель, масса 200-220 г), морских свинках (5-7 недель, вес 350-450 г) и кроликах породы Шиншилла (5-7 недель, масса 2200-2500 г). Содержание и манипуляции с животными проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Использование современных средств содержания животных» (ФБУН ГНЦ ПМБ, протокол № 7 от 11.07.2017 г.).

#### **Образцы сывороток**

Были исследованы образцы сывороток, полученные от людей больных или переболевших с установленным диагнозом туляремии и вакцинированных в соответствии с календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Были получены сыворотки от лабораторных животных, на которых проводили моделирование процессов вакцинации и заражения вирулентными штаммами *F. tularensis*.

#### **Микробиологические методы исследования**

Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37 °С на плотной питательной среде FT-агар с черным альбумином (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и на жидкой питательной среде ФТВ (Лапин А. и др., 2009) с добавлением полимиксина В (Appli-Chem, Германия) до концентрации 100 мг/л. Для получения препаратов липополисахаридов использовали штаммы *F. tularensis* различных подвидов. Бактериальные клетки культивировали на плотной питательной среде (FT-агар) при температуре 37 °С в течение 48 часов. Для получения КНК использовали вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Штаммы *E. coli* DH5α и BL21 использовали для клонирования и экспрессии гена белка FTT1696. Бактериальные клетки культивировали при температуре 37 °С в жидкой и на плотной питательной среде LB (Himedia Laboratories, Индия) (Miller J.H. 1972).

#### **Молекулярно-генетические методы исследования**

Реакции амплификации фрагментов ДНК проводили с использованием термоциклера Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия). Для ПЦР фрагментов использовали коммерческий набор High Fidelity PCR Enzyme Mix (K0191, Thermo Fisher Scientific Inc., США). Продукты реакции разделяли электрофорезом в 0,9 % агарозном геле («Sigma» США), очистку ПЦР-фрагмента проводили при помощи набора «DNA

Extraction Kit» (Fermentas, Литва). Полученными лигазными смесями трансформировали химически компетентные клетки *E. coli* штаммов DH5 $\alpha$  и BL21 с использованием набора TransformAid Bacterial Transformation Kit (K2711, Thermo Fisher Scientific Inc., США) методом «теплового шока».

#### **Биохимические методы исследования**

Получение рекомбинантного белка FTT1696. Фрагмент ДНК *F. tularensis*, кодирующий синтез белка FT 1696, клонировали в составе экспрессирующего вектора pET32b (Novagen USA). Рекомбинантный белок *F. tularensis* 1696 выделяли из штамма-продуцента *E. coli* и аффинно очищали на металло-хелатном сорбенте.

Получение и очистка туляремийного липополисахарида. Выделение липополисахарида проводили методом экстракции по Westphal (1965). Для экстракции бактериальные клетки или изолированные структурные компоненты клеточных стенок прогревали при температуре 68 °C в 45 %-ном водном растворе фенола. Очистку препаратов липополисахаридов от примесей нуклеиновых кислот проводили с использованием ферментов ДНК-азы и РНК-азы. Для очистки препаратов от белковых примесей использовали протеиназу К (Sigma). Очищенные препараты липополисахаридов лиофилизировали. При необходимости препараты липополисахаридов очищали от фосфолипидов по методу E. Bligh и W. Dyer (1951). Для проведения скрининговых исследований липополисахарид выделяли по методу P. Hitchcock и T. Brown (1983).

Масс-спектрометрия. Белки разделяли электрофоретически. Гидролиз белков, выделенных из геля, проводили трипсином. Полученные пептиды анализировали методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения. Хроматографию пептидов проводили на нанопотоковом хроматографе Easy-nLC1000 (Thermo Scientific, США) с использованием капиллярной колонки с обращенной фазой C18 (размер частиц 2,6 мкм, пор - 100Å). Элюируемые пептиды анализировали на масс-спектрометре Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Германия).

Электрофорез в денатурирующих условиях. Электрофорез антигенов проводили по методу Лэммли в 10-15% разделяющем полиакриламидном геле в присутствии натрий – додецилсульфата (SDS) (Laemmli U. 1970). Визуализацию белков в геле проводили, используя окраску PageBlue ProteinStain (Fermentas, Литва). Для визуализации ЛПС гели окрашивали аммиачным раствором оксида серебра после окисления йодной кислотой.

#### **Иммунологические методы исследования**

Иммуноблотинг проводили по H. Towbin (1979). Электроперенос белков осуществляли на нитроцеллюлозную мембрану Hybond C полусухим методом.

Иммуноферментный анализ. Липополисахарид туляремийного микроба и рекомбинантный белок FTT1696 тестировали в ИФА с сыворотками животных и человека. Анализ проводили по стандартной методике (H. Carlsson et al., 1979): антигены – FTT1696, липополисахарид *F. tularensis* – сорбировали на планшет в концентрации 1 мкг/лунку. Использовали антивидовые конъюгаты к IgG человека и животных по методике производителя.

Радиальная иммунодиффузии (Оухтерлони). Обнаружение антител проводили используя метод радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони.

Иммунохроматография. Для производства лабораторных серий иммунохроматографических тестов использовали материалы фирмы MDI (Индия). На основе наночастиц золота, конъюгированных с белком G, изготовили 2 типа ИХ тестов. В тестовую зону каждого типа тестов вносили липополисахарид *F. tularensis* или рекомбинантный белок FTT-1696. На полученных тестах проводили анализ сывороток от животных и человека в разведении 1/20.

**Электронно-микроскопические исследования** (метод негативного контрастирования). Суспензии клеток после фиксации в глутаровом альдегиде наносили на медную сеточку, покрытую формваровой плёнкой, контрастировали 1,0 % раствором уранилацетата и просматривали с помощью электронного микроскопа FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN (разрешающая способность 70А°, рабочее напряжение 120 кV). Обработку изображений, осуществляли с помощью программы Tecnai Imaging Analysis.

#### **Биоинформационные и статистические методы исследования**

Поиск нуклеотидной и аминокислотной последовательностей FTT1696 (Chaperonin GroEL) проводили с использованием баз данных на портале NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Идентификацию иммунодоминантных белков *F. tularensis* проводили масс-спектрометрическим анализом с использованием программы PeaksStudio 7,5. Математическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерной программы Excel для Windows версии 2010, рассчитывая среднюю арифметическую, стандартную ошибку средней арифметической, доверительный интервал. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием критерия Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

#### **Личное участие автора в получении результатов**

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации, осуществлялось на всех этапах работы и выразилось в анализе и обобщении литературных данных, разработке дизайна научного исследования и выполнении всего объема микробиологических, биохимических и серологических исследований. Автор лично провел статистическую обработку и анализ полученных данных, проанализировал полученные результаты, сформулировал выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Основная часть экспериментальных работ была проведена на базе ФБУН ГНЦ ПМБ: работа по выделению липополисахаридов туляремиального микроба была проведена совместно с сотрудницей отдела особо опасных инфекций к.б.н. Шайхутдиновой Р.З. Помощь в получении исследуемого материала от зараженных животных оказывали сотрудница лаборатории биологических испытаний к.б.н. Комбарова Т.И. и сотрудницы отдела особо опасных инфекций к.м.н. Титарева Г.М. и Миронова Р.И. Помощь в клонировании и выделении рекомбинантного белка FTT1696 оказали сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов к.м.н. Панферцев Е.А. и сотрудница отдела особо опасных инфекций к.б.н. Кравченко Т.Б. Конструирование ИХ-тестов проводили совместно с сотрудницей отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов к.м.н. Барановой Е.В. Электронно-микроскопические методы исследования выполнялись под руководством д.б.н. Герасимова В.Н. Масс-спектрометрические исследования антигенов *F. tularensis* проведены совместно с сотрудником «Института белка РАН» г. Пушкино к.б.н. Суриным А.К. Работа по межлабораторным испытаниям ИХ-тестов была проведена на базе ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора сотрудницей лаборатории туляремии к.б.н. Ароновой Н.В. под руководством заведующей лабораторией туляремии д.м.н. Павлович Н.В.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Комплексная оценка титров специфических антител к трем диагностически значимым антигенам – ЛПС *F. tularensis*, ЛПС *F. novicida* и рекомбинантному белку FTT1696 – повышает специфичность серологических исследований и позволяет отличить инфекционный процесс от вакцинного.
2. Оценка соотношения гидрофильной и гидрофобной части в липополисахариде бактериальных клеток *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* может служить критерием толщины капсульной составляющей клеточной

стенки и быть показателем вирулентности для некоторых подвигов (*tularensis*, *holarctica* и *mediasiatica*).

3. Использование разработанных серологических иммунохроматографических тестов на туляремию повышает эффективность экспресс-диагностики туляремии.

#### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

О достоверности результатов работы свидетельствует использование современных методов исследования, которые характеризуются высокой чувствительностью, объективностью. Использование указанных методов позволило разработать усовершенствованный подход, который позволяет проводить серодиагностические исследования на туляремию ускоренным методом с хорошей степенью достоверности.

Диссертация апробирована на межлабораторной научной конференции ФБУН ГНЦ ПМБ (протокол № 52 от 28 марта 2018 г.).

Результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на 3 международных и Всероссийской конференциях: 1-ой Международной конференции по инфекционным заболеваниям и наномедицине (Непал, Катманду, 2012); Международном симпозиуме по опасным заболеваниям (Австрия, Вена, 2014); Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств – членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Россия, Сочи, 2015); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные заболевания» (Россия, Сочи, 2017).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 4 статьи в ведущих рецензируемых изданиях, 2 тезисов - в рецензируемых изданиях, 3 – в других изданиях, 6 – в материалах конференций.

#### **Структура и объем диссертации**

Основной текст диссертации изложен на 183 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований с обсуждениями полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 294 работы, из них 74 работы отечественных и 220 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 17 таблицами.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

#### **Липополисахарид туляремиального микроба – уникальный антигенный компонент клеточной стенки**

При исследовании липополисахарида туляремиального микроба, являющегося главным антигенным компонентом его клеточной стенки, мы опирались на данные зарубежных исследователей о его структуре (Vinogradov E. et al., 1991; Vinogradov E. et al., 2002; Gunn J. et al., 2007; Apicella M. et al., 2010; Rowe H. et al., 2015). Особенностью туляремиального ЛПС является биологическая инертность очищенных препаратов, преобладание свободного липида А, наличие в нем только четырех длинных жирнокислотных остатков, наличие в коре только одного Kdo (Wang X. et al., 2006; Okan N. et al., 2013). Кроме того, в последние годы исследователи большое внимание уделяют капсуле, которая, по мнению некоторых, представляет собой полисахарид, идентичный О-антигену (Apicella M. et al., 2010; Rowe H. et al., 2015). Предполагая, что О-антиген является основной составляющей капсульного вещества, и именно его толщиной определяется вирулентность штаммов (Apicella M. et al., 2010; Rowe H. et al., 2015), мы выделили ЛПС из штаммов бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвигов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*) по методу Westphal и провели сравнительный анализ полученных препаратов. Элек-

трофорез образцов подтвердил, что традиционное окрашивание ЛПС серебром не позволяет выявлять спектр структур О-антигена с различным молекулярным весом, тем не менее, сравнение препаратов ЛПС *F. tularensis* различных подвигов и показало, что электрофореграммы всех образцов достаточно схожи (Рисунок 1).

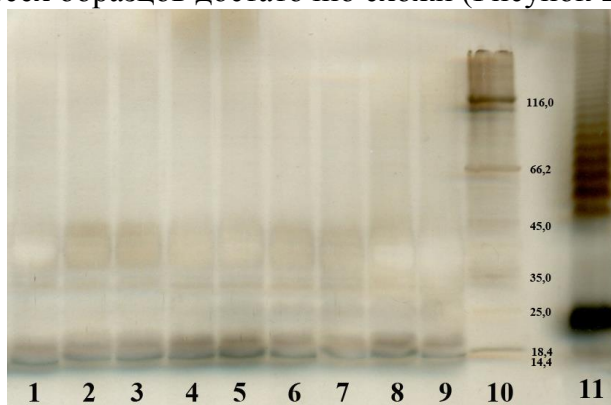


Рисунок 1 - Электрофоретическое разделение препаратов ЛПС *F. tularensis* различных подвигов, выделенных микрометодом и обработанных протеиназой К; окрашивание ионами серебра. *ssp holarctica*

Примечание: 1- 15НИИЭГ, 2- 503, 3- A1045; *ssp tularensis* 4- Schu, 5- A'Cole B-399; *ssp mediasiatica* 6- 554, 7-120, 8-678; *novicida* 9-Utah112; 10- маркер молекулярной массы, 11- ЛПС *E. coli*

Для определения иммунологически активных центров связывания препараты ЛПС были исследованы с сывороткой крысы, линии Wistar, зараженной вирулентным штаммом *F. tularensis* 678 (subsp. *mediasiatica*). На рисунке 2 представлен иммуноблот препаратов ЛПС, выделенных из бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвигов, с сывороткой крысы, где в качестве контроля использовали ЛПС *E. coli* (Рисунок 2, трек 3).

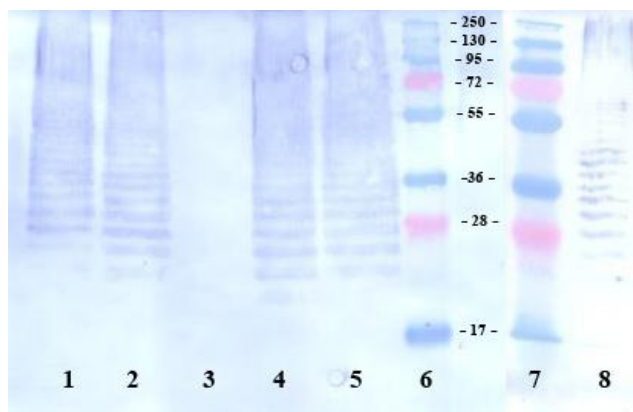


Рисунок 2 - Иммуноблот препаратов ЛПС, выделенных из бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвигов, с сывороткой крысы линии Wistar, зараженной вирулентным штаммом *F. tularensis* 678 (subsp. *mediasiatica*)

Примечание: 1 –15НИИЭГ; 2 –503; 3– *E.coli*; 4 –Schu; 5 –678; 6, 7 – маркеры молекулярной массы; 8 – *F. novicida* Utah112

Сыворотки, полученные от крыс, зараженных вирулентными штаммами всех подвигов, реагировали с ЛПС разных подвигов примерно одинаково (Рисунок 2). Тем не менее, когда препаративные количества ЛПС, выделенные из штаммов различных подвигов, были подвергнуты мягкому кислотному гидролизу, было обнаружено, что соотношение массовой доли липида А (гидрофобной) к массовой доле углеводной (гидрофильной) части отличаются в зависимости от подвида для исследованных штаммов (Таблица 1).

Таблица 1 – Результаты мягкого кислотного гидролиза липополисахаридов клеточной стенки бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов

| Штаммы<br><i>F. tularensis</i> , (метод выделения Westphal) | подвид              | Масса проб, мг | Масса липида А, мг | Масса углеводной части ЛПС, мг | Появление осадка, мин | Отношение углеводная часть/липид А |
|-------------------------------------------------------------|---------------------|----------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| 15 НИИЭГ                                                    | <i>holarctica</i>   | 70             | 0,0333             | 0,0385                         | 30                    | 1,2                                |
| 503                                                         | <i>holarctica</i>   | 70             | 0,019              | 0,0504                         | 40                    | 2,7                                |
| A-678                                                       | <i>mediasiatica</i> | 70             | 0,0258             | 0,0432                         | 60                    | 1,7                                |
| Schu                                                        | <i>tularensis</i>   | 70             | 0,0169             | 0,0506                         | 105                   | 3,0                                |
| Utah112                                                     | <i>novicida</i>     | 25             | 0,009              | 0,0159                         | 105                   | 1,8                                |

Это позволило нам предположить, что такие различия обусловлены толщиной капсульного вещества для каждого штамма. Для подтверждения нашего предположения все исследуемые штаммы исследовали методом электронной микроскопии (Рисунок 3).

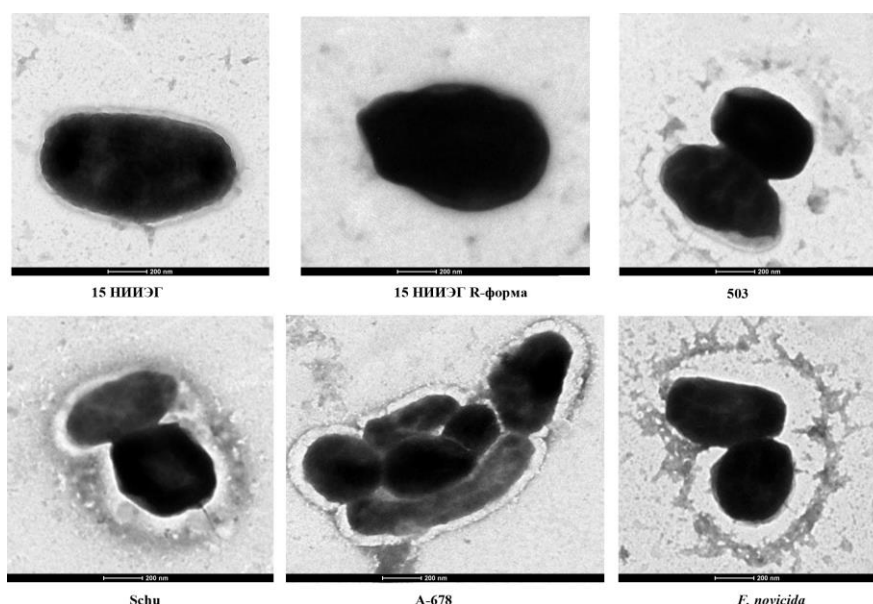


Рисунок 3 – Электронно-микроскопическое изображение негативно-контрастированных бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов

Размер капсульного вещества, определенный методом электронной микроскопии, для каждого штамма коррелировал с соотношением гидрофильной и гидрофобной части в препаратах ЛПС, полученных из этих же штаммов. У вирулентных штаммов *F. tularensis* и толщина капсулы, и соотношение гидрофильной и гидрофобной частей были выше, чем у вакцинного штамма 15НИИЭГ. Результаты исследований штамма *F. novicida* Utah112 свидетельствуют, что этот штамм обладает капсулой, которая выявляется методом электронной микроскопии и подтверждается результатами мягкого кислотного гидролиза (Рисунок 3, Таблица 1). Специфическое взаимодействие МКАТ зависит от пространственно-конформационной структуры поверхности бактериальных клеток (Roche M. et al., 2011 и Rynkiewicz M. et al., 2012). М. Apicella (2010) удалось получить моноклональные антитела, специфичные для капсулы и О-антигена *F. tularensis*, которые не связываются с *F. novicida*. Это позволяет предположить, что капсула *F. novicida* содержит отличные от основного подвида эпитопы, что подтверждается данными структурного анализа углеводной части ЛПС *F. novicida*. Возможно, что дальнейшие исследования, направленные на получение более широкого спектра МКАТ разной специфичности к О-антигену вирулентных штаммов, имеющих выра-

женную капсулу, позволило бы выявить наличие капсульных структур у *F. novicida*. К сожалению, получение мышинных МКАТ к вирулентным штаммам *F. tularensis* является очень сложной задачей ввиду высокой чувствительности мышей к этому патогену.

Полученные нами результаты электронной микроскопии и анализ продуктов мягкого кислотного гидролиза липополисахаридов исследуемых штаммов позволили нам выдвинуть предположение, что толщина капсулы у туляремийного микроба может быть связана с соотношением углеводной (гидрофильной) составляющей к липиду А (гидрофобной) молекулы ЛПС. Возможно, увеличение числа повторяющихся звеньев, составляющих структурную единицу О-антигена, обуславливает толщину капсулы и, как следствие, появление большего разнообразия эпитопов для связывания антител, которые могут реагировать и с ЛПС *F. novicida*. Именно меньшая (по сравнению с вирулентными штаммами) толщина капсулы вакцинного штамма 15НИИЭГ может служить причиной того, что после вакцинации в сыворотке вакцинированных людей и животных антитела, которые могут связываться с ЛПС *F. novicida*, не выявляются.

### **Белок GroEL FTT1696 – иммунодиагностически значимый антиген туляремийного микроба**

Полученный в ходе работы рекомбинантный белок FTT1696 по масс-спектрометрическому анализу был гомологичен нативному белку GroEL FTT1696. Учитывая литературные данные (Hubalek M. et al., 2004; Sara L. et al., 2010), был проведен анализ термолизатов представительского набора штаммов *F. tularensis* различных подвидов *subsp. tularensis*, (Schu, B-399 A-Cole), *subsp. holarctica* (503, A-1045), *subsp. mediaasiatica* (120, A-678) и *subsp. novicida* (Utah112), который показал, что белковый профиль клеток всех вирулентных штаммов не отличался от препарата вакцинного штамма (Рисунок 4).

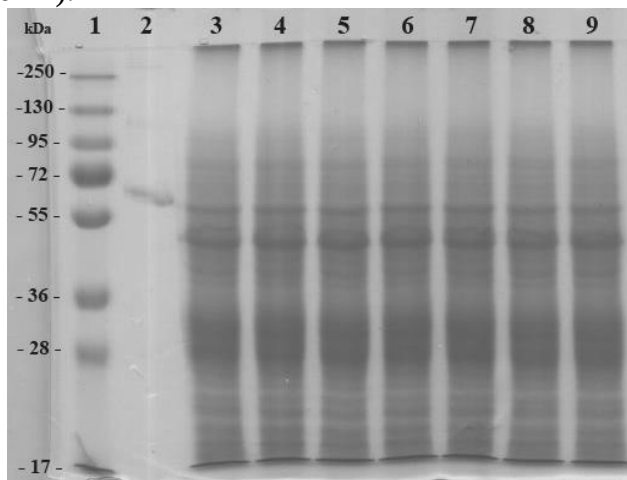


Рисунок 4 - Электрофореграмма рекомбинантного белка FTT1696 и термолизатов бактериальных клеток штаммов *F. tularensis*

*Примечание:* 1 - маркер молекулярной массы; 2 - белок FTT1696; 3,4 - Schu, A-Cole (ssp. *tularensis*); 5,6,7 – 503, 1045, 15НИИЭГ (ssp. *holarctica*); 8-9 – 120, 678 (ssp. *mediaasiatica*)

При проведении иммуноблотинга во всех образцах удалось обнаружить белок, положительно реагирующий с гипериммунной кроличьей сывороткой к рекомбинантному белку FTT1696. В биомассе термолизатов, приготовленных из *L. pneumophila*, *B. abortus* и *E. coli*, взятых в качестве контрольных образцов, белок, реагирующий с этой сывороткой, обнаружен не был (Рисунок 5). Эти результаты подтверждают литературные данные (Hubalek M. et al., 2004; Sara L. et al., 2010) об отсутствии гомологии

белка FTT1696 с белками бактерий других родов и, тем самым, свидетельствуют о высокой специфичности белка FTT1696 для *F. tularensis*.



Рисунок 5 - Иммуноблот гипериммунной кроличьей сыворотки с рекомбинантным белком FTT1696 и термолизатами бактериальных клеток

*Примечание:* 1 - маркер молекулярной массы; 2 - белок FTT1696; 3 - Schu; 4 - 503; 5 - 678; 6 - 15НННЭГ; 7 – *L. pneumophila*; 8 – *B. abortus*; 9 - *E. coli*

При исследовании сывороток крови экспериментальных животных – кроликов, крыс, морских свинок, мышей, вакцинированных и зараженных вирулентными штаммами, было показано, что у всех лабораторных животных обнаруживаются антитела к белку FTT1696. Титры антител к этому белку обычно ниже, чем титры к УЗД, однако имеют ту же тенденцию нарастания со временем (Рисунок 6).

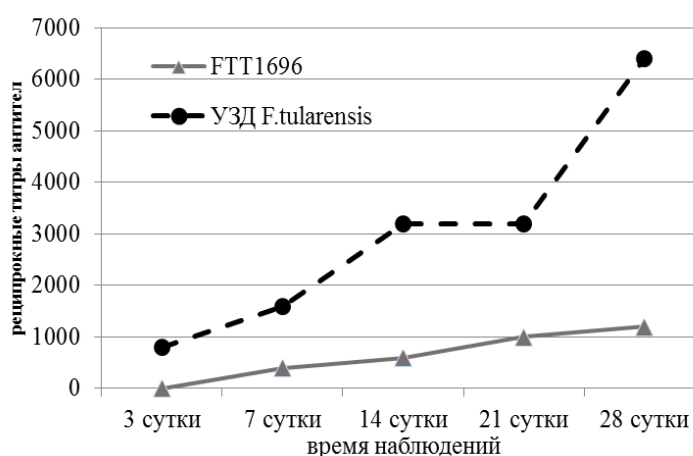


Рисунок 6 - Динамика нарастания титров специфических антител к антигенам туляремиального микроба в сыворотке кроликов, иммунизированных белком FTT1696 (пунктирная линия) и вакцинным штаммом *F. tularensis* 15НННЭГ (серая линия)

Обнаружено, что более высокие титры антител характерны для мышей, у которых введение вакцинного штамма в дозе всего 30 м.к./мышь вызывает развитие инфекционного процесса. Это, вероятно, связано с тем, что экспрессия этого белка, являющегося белком теплового шока, туляремиальным микробом усиливается при симптомах интоксикации, сопровождающейся подъёмом температуры. Это согласуется с данными зарубежных исследователей (Hubalek M. et al., 2004; Sara L. et al., 2010), свидетельствующих, что антитела к этому белку характерны для острой фазы заболевания.

Следует отметить, что у людей, переболевших туляремией и вакцинированных, антитела к белку FTT1696 наблюдались только в 50-60% случаев, что, вероятно, связано с быстро начатым лечением при заболевании (в связи с этим очень непродолжи-

тельным периодом лихорадки), а при вакцинации – с особенностями иммунной системы вакцинированных. Тем не менее, высокая специфичность белка FTT1696 позволяет рассматривать его в качестве перспективного антигена для диагностических целей, особенно как дополнительный антиген при диагностике спорадических случаев туляремии в острой фазе заболевания.

### Диагностическая значимость антигенов *Francisella ssp.* для изучения иммунитета при поствакцинальном и постинфекционном процессе у людей и лабораторных животных

Был проведен анализ и выбор высокоспецифичных иммунодоминантных антигенов *F. tularensis*, универсальных для трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*) и оценка их диагностической значимости.

Для оценки клеточного иммунитета использовали такие антигены, как коммерческий препарат тулярин, лабораторный образец ультразвукового дезинтеграта (УЗД), препарат КНК, рекомбинантный белок FTT1696 и очищенный препарат ЛПС *F. tularensis* (ЛПС Ft). Для изучения гуморального иммунитета использовали УЗД, рекомбинантный белок FTT1696 и препараты ЛПС *F. tularensis* (ЛПС Ft) и *F. novicida* (ЛПС Fn).

Клеточный иммунитет изучали при разных способах введения вакцинного штамма *F. tularensis* 15НИИЭГ и при иммунизации экспериментальными штаммами с разной степенью аттенуации на основе штамма 15НИИЭГ с инактивированными генами с целью выявления возможных отличий в степени напряженности иммунитета при использовании различных антигенов туляремиального микроба.

Результаты, полученные при изучении параметров клеточного иммунитета, свидетельствуют, что препараты тулярин, УЗД и КНК индуцируют выработку гамма-интерферона спленоцитами вакцинированных мышей примерно в равной степени (отличия не достоверны) и равноценно могут быть использованы в экспериментах по оценке напряженности клеточного звена иммунитета (Рисунок 7).

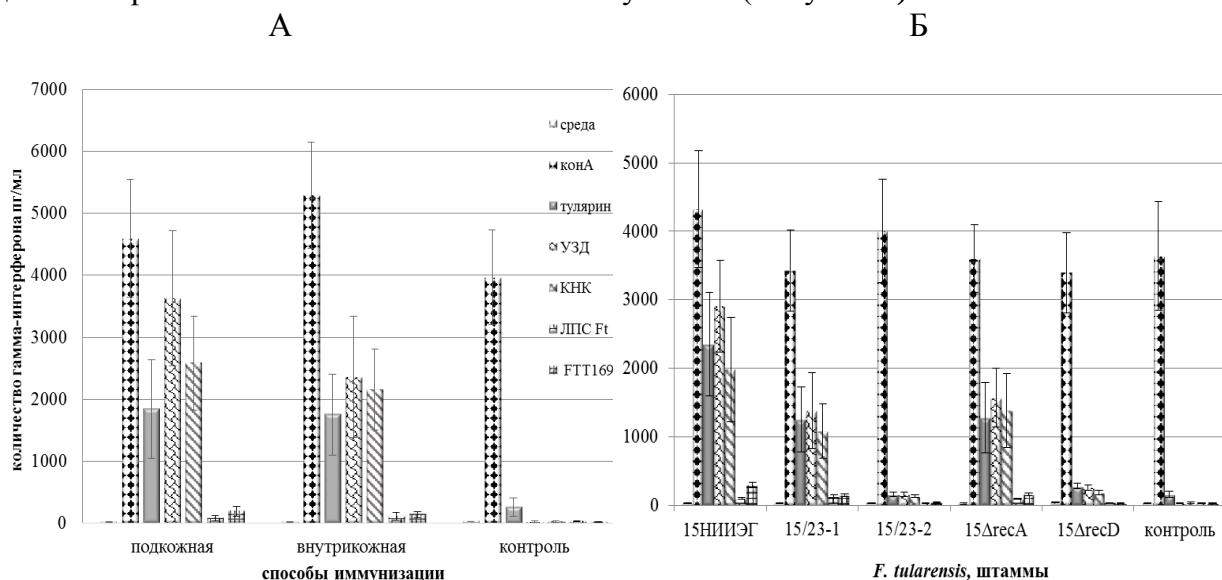


Рисунок 7 – Способность антигенов *F. tularensis* вызывать индукцию гамма-интерферона *in vitro* иммунокомпетентными клетками мышей

Примечание: А – при различных способах иммунизации штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ; Б – при вакцинации штаммами с различной степенью аттенуации

Тем не менее, следует отметить, что наибольший (без достоверных отличий) уро-

вень синтеза этого цитокина у иммунных животных вызывает УЗД; препарат тулярин вызывает незначительную стимуляцию спленоцитов не иммунных животных (достоверно отличающуюся от иммунизированных мышей), а препарат КНК более стандартизован, охарактеризован, стабилен и может иметь длительный срок хранения. Препараты рекомбинантного белка FTT1696 и очищенный ЛПС Ft мало пригодны для этой цели, поскольку очень слабо индуцируют продукцию гамма-интерферона спленоцитами (Рисунок 7). При эффективной иммунизации, о чем свидетельствует ответ на тулярин, УЗД и КНК, синтез гамма-интерферона спленоцитами, стимулированными FTT1696 и ЛПС Ft, достоверно отличается от не иммунизированных животных. Тем не менее, количество цитокина при стимуляции спленоцитов препаратами FTT1696 и ЛПС Ft в 10 и более раз ниже (у иммунных животных), чем при использовании в качестве антигенов препаратов тулярина, УЗД и КНК. Таким образом, очевидно, что для оценки клеточного иммунитета лучше использовать комплексные антигены *F. tularensis*.

При диагностике туляремии в практической медицине наиболее распространённым методом остаётся определение специфических антител к возбудителю в сыворотке крови. Традиционно в агглютинационных тестах для серодиагностики используются убитые цельные микробные клетки. В последние годы для выявления специфических антител чаще всего используют очищенный препарат ЛПС *F. tularensis* (Porsch-Ozcurumez M. et al., 2004; Schmitt P. et al., 2005; Splettstoesser W. et al., 2010; Sharma N. et al., 2013; Chaignat V. et al., 2014). Тем не менее, в некоторых случаях антитела к этому антигену не обнаруживаются. Это может иметь место в начальной острой фазе заболевания, когда крайне важна установка диагноза. Поэтому, возможно, обнаружение антител к белку теплового шока FTT1696, обладающего высокой специфичностью и иммунореактивностью, может иметь большое диагностическое значение (Sara L. et al., 2010).

При изучении гуморального иммунитета мы исследовали целесообразность использования изучаемых нами антигенов *F. tularensis* – УЗД, препаратов ЛПС Ft, ЛПС Fn и рекомбинантного белка FTT1696 для диагностики инфекционного процесса, вызываемого возбудителем туляремии трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*) и поствакцинального иммунитета.

Для этих целей нами была собрана коллекция сывороток людей, переболевших туляремией и вакцинированных, а также сывороток лабораторных животных, вакцинированных и зараженных вирулентными штаммами различных подвидов. Количество сывороток людей, переболевших туляремией в нашей коллекции, в силу объективных обстоятельств было ограничено. Все они перенесли тулярию, вызванную возбудителем *F. tularensis* голарктического подвида. Лабораторных животных (мышей, морских свинок, крыс и кроликов) заражали вирулентными штаммами разных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*). Вакцинацию как людей, так и животных проводили вакцинным штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ.

Результаты исследования сывороток переболевших туляремией людей свидетельствуют, что титры антител к УЗД и ЛПС Ft были либо одинаковыми (67%), либо титры к УЗД в 2 раза превышали титры к ЛПС Ft (33%), а титры к рекомбинантному белку FTT1696 находились в диапазоне от 1 : 400 до 1 : 800 и наблюдались только в 56% случаев. Взаимодействие сывороток людей, перенесших тулярию с ЛПС Fn смогли зарегистрировать только методом дот-блота тоже только в 56%. Это согласуется с данными Павлович Н. В. (устное сообщение, не опубликованные данные), что антитела к ЛПС Fn обнаруживаются у заболевших или переболевших не во всех случаях.

Исследование коллекции сывороток вакцинированных людей проводили в два этапа. На первом этапе мы проанализировали диагностическую значимость препаратов

УЗД, ЛПС Ft и FTT1696, используя метод двухступенчатого иммунохимического анализа, включающего скрининг сывороток в ИФА и исследование сывороток методом иммуноблоттинга. Было показано, что по результатам ИФА наиболее близкими по значениям были титры к УЗД и к ЛПС Ft.

В случаях, когда результаты ИФА свидетельствовали об отсутствии антител к ЛПС Ft, либо значения титров были 1:800 и ниже, проводили оценку специфичности взаимодействий методом иммуноблоттинга (Рисунок 8).

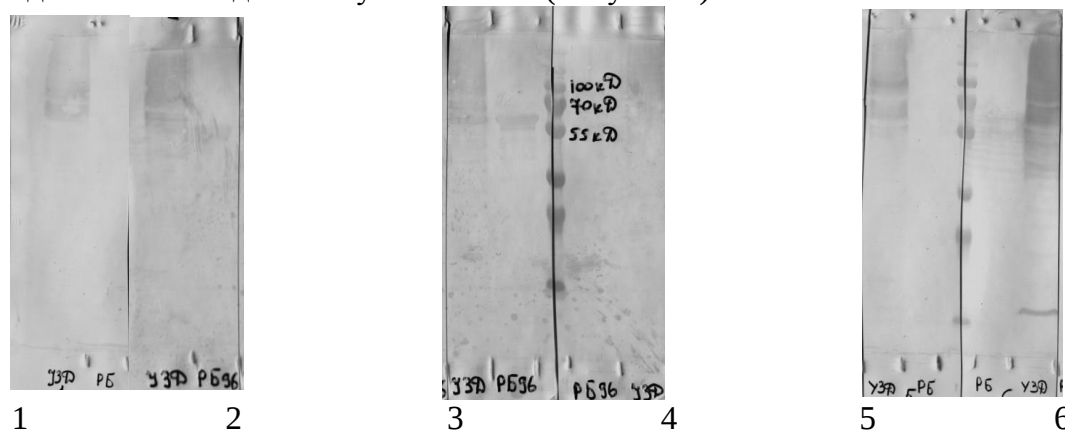
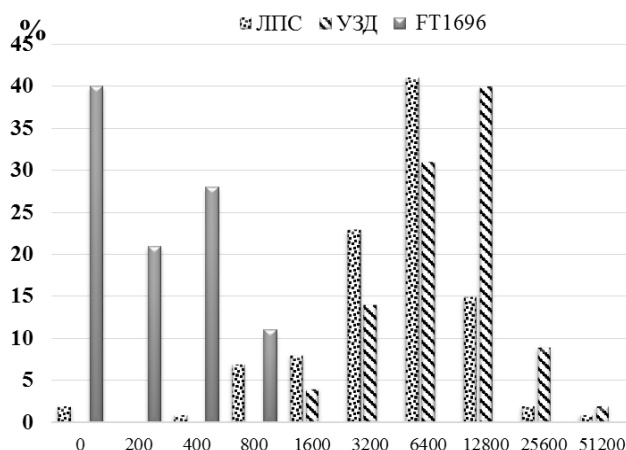


Рисунок 8 – Иммуноблот с сыворотками людей (1,2,3,4,5,6), переболевших туляремией во время вспышки в Ханты-Мансийске в 2013 г., к рекомбинантному белку FTT1696 и УЗД *F. tularensis*.

Полученные результаты свидетельствуют, что, в случаях отсутствия антител к ЛПС Ft в ИФА, титры к УЗД зачастую обусловлены неспецифическими взаимодействиями, что подтверждается результатами иммуноблоттинга с контрольными Ig человека. Титры антител к белку FTT1696, были обнаружены только у 60 % вакцинированных, что вероятно обусловлено низкой реактогенностью вакцины, тем не менее, в 28% случаев титр антител составлял 1:400, а в 11% - 1:800 (Рисунок 9).



Реципрокные значения титров специфических антител

Рисунок 9 – Соотношение сывороток (%) с реципрокными титрами к соответствующим антигенам тулярийного микроба среди вакцинированных людей в Тульской области

На втором этапе мы провели сравнительный анализ результатов серологических исследований традиционного метода РНГА и ИФА с использованием в качестве антигена ЛПС Ft. Было показано, что разброс значений титров, определенных методом ИФА, имеет нормальный тип распределения (распределение Гаусса). В случае же определения титров антител методом РНГА почти 47% сывороток дали отрицательный результат, разброс положительных значений не имел нормального распределения, что не характерно для биомедицинских показателей. Эти данные позволяют говорить

о высокой специфичности и хорошей диагностической значимости использования ЛПС Ft в качестве антигена (Рисунок 10).

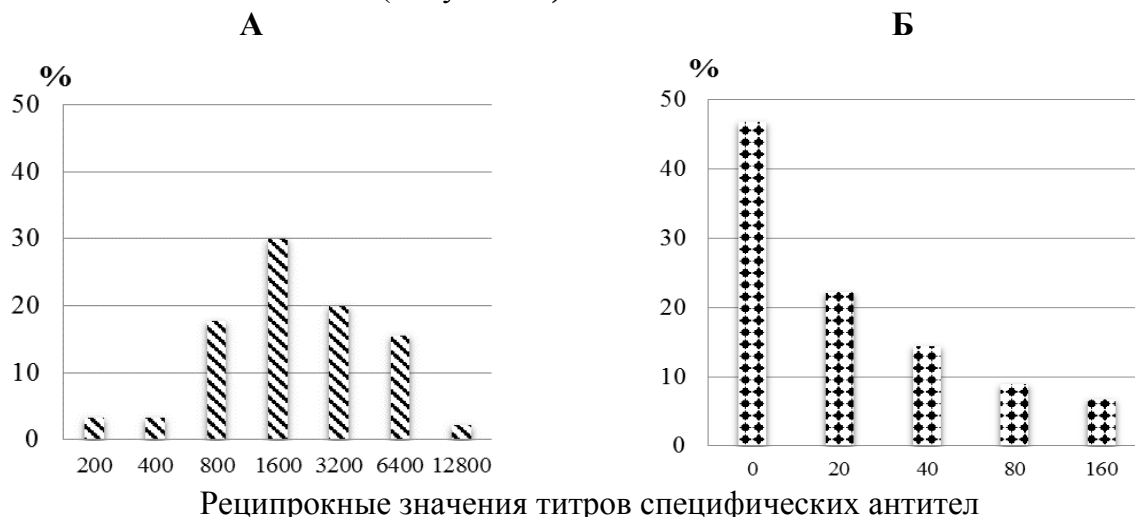


Рисунок 10 – Соотношение сывороток (%) с соответствующими титрами среди вакцинированных людей в Алтайском крае.

*Примечание:* А – титры антител, определенные методом ИФА с использованием ЛПС F.t в качестве антигена; Б – титры антител, определенные методом РНГА с антигенным эритроцитарным туляреминым диагностикумом

Особый интерес представляют сыворотки животных, зараженных вирулентными штаммами разных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*). Мышей и морских свинок заражали после предварительной вакцинации, потому что LD<sub>50</sub> для вирулентных штаммов для этих высокочувствительных к туляремии животных составляет единичные клетки. Крыс заражали вирулентными штаммами как после предварительной иммунизации, так и не вакцинированных. Для заражения кроликов использовали вирулентные штаммы только двух подвидов *holarctica* и *mediasiatica*.

Наибольший интерес представляют данные, полученные при исследовании сывороток мышей линии BALB/c. У этого вида животных как после вакцинации (до 90 суток), так и после заражения в сыворотке определялись антитела к белку FTT1696, при этом антител к ЛПС Fn после заражения вирулентными штаммами обнаружить не удалось. Наличие антител к ЛПС Ft после вакцинации наблюдали на протяжении полугода после однократной вакцинации. После заражения вирулентными штаммами титр специфических антител к ЛПС Ft в сыворотках мышей возрастал в 2-8 раз, а в сыворотках морских свинок в 8-250 по сравнению с титрами антител после вакцинации.

В отличие от мышей, у всех остальных животных (морских свинок, кроликов и крыс) после заражения вирулентными штаммами всех трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*), определяемые методом дот-блота, наблюдали появление антител к ЛПС Fn (Рисунок 11).

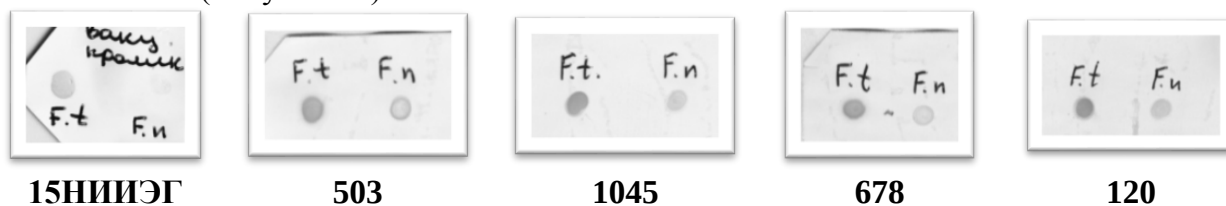
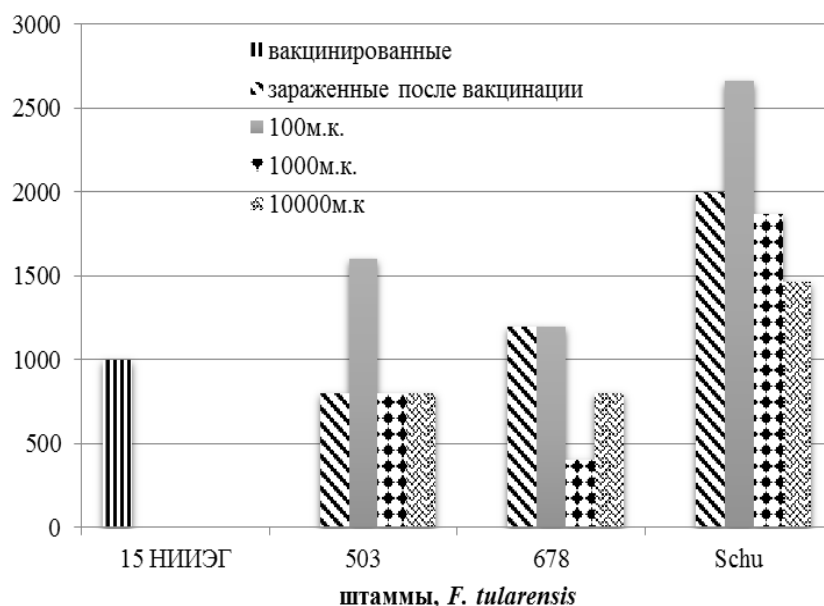


Рисунок 11 – Дот-блоты сывороток кроликов, вакцинированных штаммом 15НИИЭГ и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* голарктического (503 и 1045) и среднеазиатского (678 и 120) подвидов с ЛПС Ft и ЛПС Fn



#### Реципрокные значения титров специфических антител

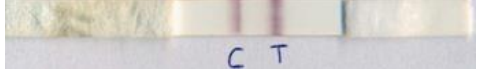
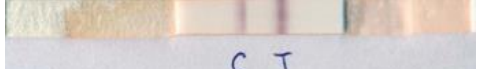
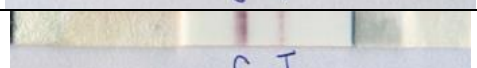
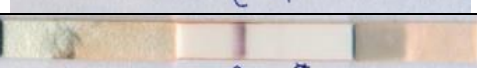
Рисунок 12 – Титры специфических антител к ЛПС Ft, определенных методом ИФА, у крыс линии Wistar, вакцинированных и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* разных подвидов

Заражение кроликов штаммами гюларктического подвида вызывает большее повышение титра антител, чем заражение штаммами среднеазиатского подвида. Вероятно, острый инфекционный процесс, вызываемый большой дозой (у крыс) или введение более вирулентных штаммов (среднеазиатский для кроликов), вызывают некоторое угнетение антителообразования, что обуславливает более низкие значения титров. У крыс, зараженных разными дозами вирулентных штаммов (от 100 до 10000 м.к./крысу), антитела к ЛПС Fp были обнаружены во всех сыворотках независимо от дозы заражения. Однако при иммунизации вакцинным штаммом 15НИИЭГ ни у одного вида животных не были обнаружены антитела, взаимодействующие с ЛПС Fp. При заражении крыс вирулентными штаммами без предварительной вакцинации было обнаружено, что наиболее низкая заражающая доза вызывает наибольшее нарастание титра антител для всех подвидов *F. tularensis* (Рисунок 12).

#### Создание и апробация иммунохроматографических тестов с антигенами туляремийного микроба для экспрессной серодиагностики туляремии

Изготовленные экспериментальные образцы тест-систем были протестированы на стандартных препаратах сывороток – сильноположительной, среднеположительной, пороговой слабоположительной и отрицательной сыворотках. Для сывороток величина разведения для ИФА составляла 1 : 400. Соответственно, сыворотки, дающие положительный результат в разведении 1 : 400 и более, учитывались, как положительные. Полученные результаты (Таблица 2) подтверждают достоверность диагностики с помощью разработанной тест-системы: наличие или отсутствие окрашивания аналитической зоны соответствует содержанию антител в препаратах. Окрашивание аналитической зоны тест-системы при использовании сыворотки соответствовало пределу визуальной детекции.

Таблица 2 - Тестирование стандартизованных препаратов сывороток с использованием разработанной иммунохроматографической тест-системы

| № | Типы стандартных образцов сывороток | Реакция в ИХ-тесте                                                                 |
|---|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | сильноположительная сыворотка       |  |
| 2 | среднеположительная сыворотка       |  |
| 3 | слабоположительная сыворотка        |  |
| 4 | отрицательная сыворотка             |  |

Для определения валидности экспериментальной тест-системы в качестве эталонной референсной тест-системы была использована коммерческая ИФА тест-система («ELISA classic *Francisella tularensis* IgG» (SERION, Германия). Для сравнения экспериментальных данных были использованы результаты, полученные при исследовании тех же сывороток с рекомендованным к применению коммерческим тулярийным серодиагностиком («РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ»). При анализе результатов было показано, что специфичность экспериментального ИХ-теста составила 100 %, а чувствительность – 94,3 %. Напротив, чувствительность коммерческого тулярийного РНГА диагностикума оказалась низкой - всего лишь 59,1 % при специфичности в 80 %, что еще раз свидетельствует об актуальности и своевременности постановки вопроса о необходимости разработки отечественных современных высокочувствительных и специфичных тестов.

Нами были разработаны и апробированы ИХ-тесты с изученными антигенами ЛПС Ft, FTT1696 и ЛПС Fn. Полученные результаты свидетельствуют, что ИХ-тесты с ЛПС Ft при проведении всех исследований в рамках установленных регламентов могут быть рекомендованы для серологических исследований для диагностики туляремии, для мониторинговых серологических исследований вакцинированных людей и для оценки эпидемиологической обстановки в природных очагах. При необходимости дополнительных исследований по дифференциальной диагностике постинфекционного и поствакцинального тулярийного иммунитета можно использовать ИХ-тесты с ЛПС Fn. ИХ-тесты с FTT1696 могут иметь большое диагностическое значение в виду высокой специфичности данного белка.

## ВЫВОДЫ

1. В качестве антигенов для стимуляции иммунокомпетентных клеток при оценке напряженности клеточного иммунитета по уровню индуцированного гамма-интерферона при туляремии могут быть в равной степени использованы такие комплексные антигены бактерий *F. tularensis*, как ультразвуковой дезинтеграат, кислотонерастворимый комплекс и тулярин.

2. Оценку гуморального иммунитета при туляремии наиболее целесообразно проводить методом иммуноферментного или иммунохроматографического анализа с использованием липополисахарида *F. tularensis* в качестве антигена, дающих меньшее количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

3. На большой выборке сывороток лабораторных животных разных видов, инфицированных вирулентными штаммами, а также сывороток людей, переболевших тулярией и вакцинированных, получило подтверждение положение о том, что обнаружение антител к липополисахариду *F. novicida* может служить важным признаком для

дифференциации инфекционного и вакцинального процессов у людей и животных, за исключением мышей линии BALB/c.

4. Обнаружение в сыворотке крови антител к высокоспецифичному белку *F. tularensis* FTT1696 может служить дополнительным основанием для постановки диагноза туляремии, начиная с острой фазы заболевания.

5. Коэффициент отношения гидрофильной и гидрофобной части в препаратах липополисахаридов штаммов *F. tularensis* различных подвигов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*) может служить критерием предварительной оценки толщины слоя капсульного вещества тулярийного микроба.

6. Успешная апробация разработанных ИХ-тестов на основе ЛПС Ft, ЛПС Fn и белка FTT1696 позволяет рассматривать их в качестве перспективных современных экспресс-систем для оценки иммунитета к туляремии.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Результаты проведенных исследований доказывают необходимость широкого внедрения в практику разработанного и апробированного нами иммуноферментного анализа с использованием очищенного препарата липополисахарида *F. tularensis* в качестве адсорбированного антигена.

ИХ-тесты с липополисахаридом *F. tularensis* можно рекомендовать для мониторинговых эпидемиологических обследований природных очагов туляремии.

Рассмотреть вопрос о замене рутинных агглютинационных тестов на более простые ИХ-тесты, позволяющие проводить исследования на месте в ускоренном варианте и не требующие высокой квалификации персонала.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Будут продолжены исследования капсульного вещества и липополисахаридов клеточной стенки штаммов *F. tularensis* различных подвигов и *F. novicida*. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии планируется провести фракционирование выделенных препаратов с целью уточнения корреляции соотношения гидрофобной и гидрофильной части ЛПС и толщины капсульного вещества различных штаммов *F. tularensis* и *F. novicida*.

Провести дополнительные испытания ИХ-тестов с ЛПС Fn на сыворотках людей, болеющих или перенесших туляремию, с целью верификации данных тестов для дальнейшего использования их в лабораторной дифференциальной диагностике туляремии.

Провести клонирование других перспективных для иммунодиагностики белков тулярийного микроба для получения дополнительных антигенов, расширяющих возможности по созданию многокомпонентной системы для диагностики туляремии.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Firstova, V.V. Markers of immunity correlated with protection against *Francisella tularensis* infection / V.V. Firstova, T.I. Kombarova, A.N. Mokrievich, V.M. Pavlov, **A.A. Gorbatov**, E.V. Baranova, S.F. Biketov // Book of abstract of the first International Conference on Infection Diseases and Nanomedicine (Kathmandu, Nepal. 15-18 Dec.). - 2012. - P. 21.
2. Фирстова, В.В. Использование антигенов *F.tularensis* для выявления клеточного противотулярийного иммунитета / В.В. Фирстова, В.М. Павлов, **А.А. Горбатов**, И.А. Дятлов // Физиология и патология иммунной системы. – 2013. – № 4. – С. 14-20.
3. **Горбатов, А.А.** Применение антигенных препаратов *F. tularensis* для оценки специфического иммунитета людей, вакцинированных живой тулярийной вакциной / **А.А. Горбатов**, П.В. Соловьев, В.В. Фирстова, Е.В. Зырина, С.Ф. Бикетов // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), № 2-3. – С. 246.

4. Firstova, V.V. Immunological Markers that Correlate with Protection Immunity Against Tularemia Infection / V.V. Firstova, A.N. Mokrievich, V.M. Pavlov, A.A. Gorbatov, S.F. Biketov, I.A. Dyatlov // Adv Exp Med Biol. – 2014. – Vol. 808. – P. 15-23
5. Фирстова, В.В. Влияние степени воспаления у мышей линии Balb/c, индуцированного разными дозами *F.tularensis* 15 НИИЭГ, на формирование антитуляремийного клеточного и гуморального иммунного ответа / В.В. Фирстова, В.М. Павлов, А.А. Горбатов, Т.И. Комбарова, А.В. Караулов, И.А. Дятлов // Иммунология. – 2014. – № 35 (3). – С. 147-150.
6. Фирстова, В.В. Использование методов цитометрии для оценки специфического клеточного иммунитета / В.В. Фирстова, О.В. Калмантаева, П.Х. Копылов, А.А. Горбатов, В.М. Павлов, С.А. Иванов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9(18). – № 2(2). – С. 120-122.
7. Gorbatov, A. Detection of specific antibodies to *Francisella tularensis* antigens to differentiates vaccine and infection process / A. Gorbatov, P. Solov'ev, V. Firstova, E. Baranova, E. Panfertsev, A. Mokrievich, N. Pavlovich, N. Aronova, S. Biketov // International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (Austria, Viena, 31 October, 2014). – 2014. – P. 82.
8. Горбатов, А.А. Использование антигенов *F. tularensis* для диагностики и дифференциации поствакцинального и инфекционного гуморального иммунитета при туляремии / А.А. Горбатов, П.В. Соловьев, Т.И. Комбарова, Р.И. Миронова, Г.М. Титарева, А.Н. Мокриевич, С.Ф. Бикетов // Материалы Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств – членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» (г. Сочи, 25-26 мая, 2015). – 2015. – С. 159-163.
9. Фирстова, В.В. Специфические клеточные реакции, отражающие наличие поствакцинального противотуляремийного иммунитета / В.В. Фирстова, О.В. Калмантаева, А.А. Горбатов, Е.А. Тюрин // Бактериология. – 2016. – Т 1, № 1. – С. 102-108.
10. Горбатов, А.А. Диагностическая значимость рекомбинантного белка GroEL FTT\_1696 для выявления противотуляремийных антител / А.А. Горбатов, Е.А. Панферцев, Е.В. Баранова, П.В. Соловьев, Т.И. Комбарова, Г.М. Титарева, Т.Б. Кравченко, А.Н. Мокриевич, С.Ф. Бикетов // Бактериология. – 2017. – Т 2, № 3. – С. 9-15.
11. Горбатов А.А., Изучение влияния строения О-антигена липополисахарида *Francisella tularensis* разных подвидов, на иммунологические реакции со специфическими антителами / А.А. Горбатов, Р.З. Шайхутдинова, Т.Б. Кравченко, Г.М. Титарева, В. Герасимов, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо-опасные заболевания» (г. Сочи, 1-4 ноября 2017г.). – 2017. – С. 60-62.
12. Горбатов, А.А. Особенности иммунологических реакций при туляремии у лабораторных животных в серологических реакциях с ЛПС *Francisella tularensis* / А.А. Горбатов, Р.З. Шайхутдинова, Т.Б. Кравченко, Т.И. Комбарова, Г.М. Титарева, А.Н. Мокриевич, В.В. Фирстова // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные заболевания» (г. Сочи, 1-4 ноября 2017г.). – 2017. – С. 59-60.
13. Горбатов, А.А., Сравнительный анализ данных серологических исследований при мониторинге эффективности вакцинации от туляремии в республике Алтай / А.А. Горбатов, Е.С. Куликалова, В.С. Тимофеев, И.В. Бахтеева, А.С. Пинчук,

Г.М. Титарева, Е.В. Баранова, А.К. Сынгеева, Е.Н. Рождественский, Г.Х. Базарова, Е.М. Минина, С.Ф. Бикетов, А.Н. Мокриевич // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные заболевания» (г. Сочи, 1-4 ноября 2017г.). – 2017. – С. 57-59.

14. **Горбатов, А.А.** Оценка валидности и надежности ИХ-теста на основе ЛПС *Francisella tularensis* для экспрессного выявления специфических антител к возбудителю туляремии / А.А. Горбатов, Е.В. Баранова, Т.Б. Кравченко, Г.М. Титарева, С.Ф. Бикетов // Проблемы медицинской микологии. - 2018. - Т.20(2). - С.63.

15. **Горбатов, А.А.** Сравнительное исследование экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуляремийных антител у людей / А. А. Горбатов, П. В. Соловьёв, Е. В. Баранова, Г. М. Титарёва, Е. С. Куликалова, С. Ф. Бикетов, А. В. Мазепа // Клиническая лабораторная диагностика. - 2018. - Т.63(10). - С. 630-635.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

|                  |                                                               |
|------------------|---------------------------------------------------------------|
| ГКПМ–            | — Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и кле- |
| Оболensk         | точных культур – Оболensk                                     |
| ИФА              | — иммуноферментный анализ                                     |
| ИХ-тест          | — иммунохроматографический-тест                               |
| КНК              | — кислотонерастворимый комплекс                               |
| ЛПС              | — липополисахарид                                             |
| МКАТ             | — моноклональные антитела                                     |
| п.о.             | — пара (нуклеотидных) оснований                               |
| ПЦР              | — полимеразная цепная реакция                                 |
| РА               | — реакция агглютинации                                        |
| РНГА             | — реакция непрямой гемагглютинации                            |
| FT               | — среда для культивирования туляремийного микроба             |
| in vitro         | — эксперимент “в пробирке”, без использования животных        |
| LB               | — среда Luria-Bertani                                         |
| LD <sub>50</sub> | — летальная доза для 50 % популяции животных                  |