

## СРАВНЕНИЕ РАННЕГО ИММУННОГО ОТВЕТА МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ТУЛЯРЕМИЙНЫМ ВАКЦИННЫМ ШТАММОМ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМИ

© 2019 г. А. С. Карцева\*, М. В. Силкина, О. В. Калмантаева, Р. И. Миронова, В. В. Фирстова, В. М. Павлов, И. Г. Шемякин

\*E-mail: kartseva\_as@mail.ru

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Роспотребнадзора, Оболенск, Россия

Поступила: 22.05.2019. Принята: 27.06.2019

В работе приведены сравнительные данные специфического иммунного ответа у мышей после их иммунизации бактериями *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными *F. tularensis* SRI-1 или *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA. Штамм *F. tularensis* SRI-1 обеспечивал 100% защиту мышей от подкожного заражения высоковирулентным штаммом *F. tularensis* Schu в дозе 3000 КОЕ/мышь. На 30 сутки иммуногенеза уровень титров антител к ЛПС *F. tularensis* во всех группах иммунизированных животных был практически одинаков. В ранние сроки иммуногенеза выявлены повышенная активация В-лимфоцитов и цитотоксических лимфоцитов в крови и увеличенное содержание активированных цитотоксических лимфоцитов в селезенке у мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1, в отличие от двух других иммунных групп животных.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, вакцина, цитометрия, лимфоциты, протективный иммунитет

DOI: 10.31857/S102872210007250-0

**Адрес:** Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Карцева Алена Сергеевна. Тел.: +74967312084.

**E-mail:** kartseva\_as@mail.ru

**Авторы:**

**Карцева А. С.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Силкина М. В.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Калмантаева О. В.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Миронова Р. И.**, научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Фирстова В. В.**, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Павлов В. М.**, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории микробиологии туляремии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Шемякин И. Г.**, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Туляремия представляет собой зоонозное природно-очаговое инфекционное заболевание, вызываемое внутриклеточной бактерией *Francisella tularensis*. Вакцинопрофилактику туляремии на территории России проводят вакциной туляремиальной живой сухой, созданной на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [1]. В странах Западной Европы и Северной Америки вакцинопрофилактику проводят по показаниям только среди военнослужащих, используя живую вакцину, содержащую штамм *F. tularensis* LVS (Live Vaccine Strain), полученный в результате многочисленных пассажей *F. tularensis* 15 *in vitro* [2, 3]. Существующие аттенуированные вакцинные штаммы формируют длительный иммунитет против туляремии (5 лет), но характеризуются умеренной реактогенностью и генетической нестабильностью [4, 5]. Кроме

того, вакцинные штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS не формируют протективный иммунитет против аэрозольного заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* subsp. *tularensis*, что показано на многих биологических моделях [6, 7, 8]. Поэтому разработка безопасной и протективной туляремиальной вакцины является актуальным вопросом.

Многолетние исследования возбудителя туляремии позволили охарактеризовать метаболизм бактерий, выяснить механизмы их внутриклеточного размножения и реакции иммунной системы на патоген [9, 10]. Генетические методы направленной модификации генома *F. tularensis* и полногеномное секвенирование подвидов туляремиального микроба позволило получить новые вакцинные штаммы [11]. В нашем научном Центре было создано 2 штамма-кандидата в вакцинные: *F. tularensis* SRI-1 (с инактивированными генами *iglC* (одной копией) и *recA*, а также модификацией гена *sodB*) и *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA (с инактивированными генами *iglC* (одной копией) и *recA*). Полученные штаммы характеризуются снижением реактогенности по сравнению с исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ [12, 13].

Уровень протективности иммунитета определяется в ранние сроки после вакцинации, когда происходит активация отдельных субпопуляций иммунокомпетентных клеток (ИКК), запускается синтез цитокинов и регулируется пролиферативная активность лимфоцитов.

**Цель исследования** – сравнить ранний иммунный ответ лимфоцитов мышей после иммунизации *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производными: *F. tularensis* SRI-1 и *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора (рп Оболенск).

Мышей BALB/c (ФИБХ Питомник «Пушино», МО, г. Пушино) – по 10 особей в группе – иммунизировали однократно, подкожно в дозе  $10^2$  КОЕ/мл вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* SRI-1 или *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA («ГКПМ-Оболенск»). В качестве контроля выступала группа интактных мышей.

На 3 сутки после иммунизации по 5 животных каждой группы эвтаназировали, получали кровь и селезенки, откуда выделяли лимфоциты на градиенте плотности Histopaque-1,077

(Sigma, США). Субпопуляционный состав лимфоцитов определяли с использованием следующих комбинаций моноклональных антител: активированные цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы – CD45 APC-су7, CD3 FITC, CD4 APC, CD69 PE, CD25 PerCP-су5.5, CD30 PE, CD28 PerCP-су5.5; активированные В-лимфоциты – CD19 APC, CD69 FITC, CD25 PerCP-су5.5, CD30 PE, CD86 PE (все производства eBioscience, США). Цитометрические исследования проводили на проточном цитофлюориметре FACSAria III (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (версия 8.0).

Для определения протективной активности вакцинных штаммов животным на 30 сутки после их иммунизации подкожно вводили в дозе 1000 LD<sub>50</sub> (3000 КОЕ) тест-заражающий штамм *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu. Наблюдение за животными вели в течение 21-х суток.

Перед заражением у животных получали сыворотку крови для определения антител к липополисахариду (ЛПС) *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом иммуноферментного анализа согласно руководству [14]. Учет результатов проводили на приборе Thermo Scientific Varioskan Flash (Thermo Scientific, США).

**Статистика.** Систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2013. Данные по титрам антител выражали при помощи среднеарифметического значения группы и его стандартного отклонения. Результаты цитометрических данных описывались при помощи среднеарифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (m). Достоверность отличий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни (при  $p < 0,05$ ) для независимых совокупностей [15] с помощью программы IBM SPSS Statistics версии 23.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

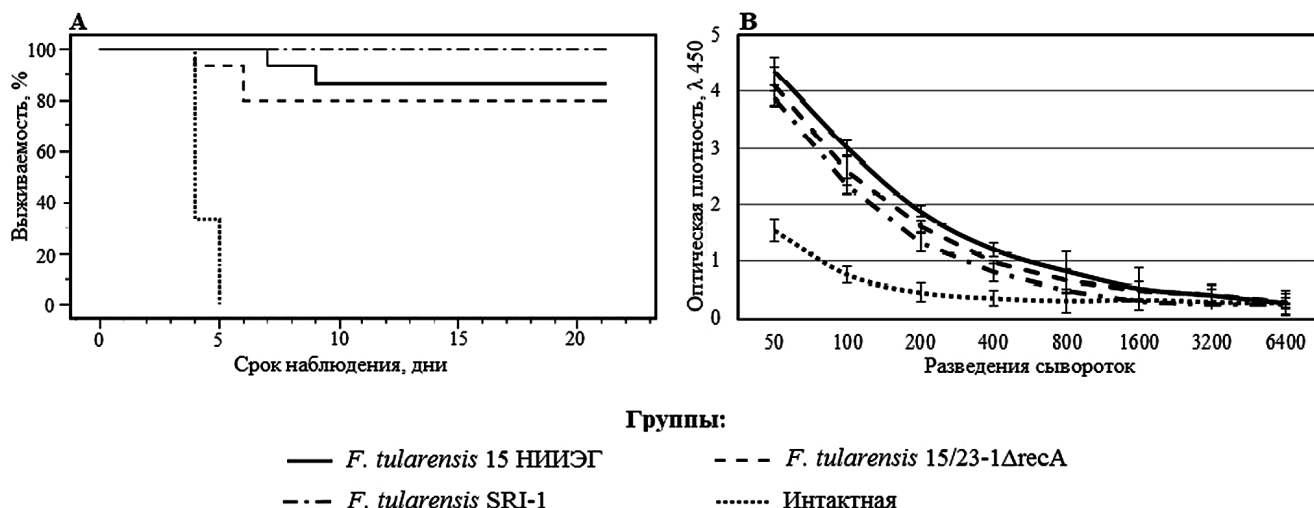
Мыши, иммунизированные *F. tularensis* SRI-1, были полностью защищены от заражения высоковирулентным штаммом *F. tularensis* Schu (**Рис. 1А**). Животные, иммунизированные *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA, выживали в 86,7% и 80% случаев, соответственно. Все мыши интактной группы погибли к 5-м суткам после заражения *F. tularensis* Schu.

На 30 сутки после иммунизации во всех группах иммунизированных животных в сыворотке

**Таблица 1.** Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов, полученных из крови и селезенок мышей линии BALB/c, после иммунизации штаммами *F. tularensis* (M±m).

| Субпопуляции лимфоцитов                             | Группы мышей*                 |                            |                                     |           | p**                                          |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-----------|----------------------------------------------|
|                                                     | <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ | <i>F. tularensis</i> SRI-1 | <i>F. tularensis</i> 15/23-1 Δ recA | Контроль  |                                              |
| Показатели крови, %                                 |                               |                            |                                     |           |                                              |
| CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>                 | <b>7,56±0,60</b>              | <b>7,74±0,53</b>           | 4,56±0,39                           | 3,06±0,9  | p <sub>2</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,05 |
| CD19 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>                 | <b>8,4±0,86</b>               | 5,02±0,23                  | 5±0,15                              | 4,96±0,09 | p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,05 |
| CD19 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>                 | 3,68±0,30                     | <b>7,36±0,59</b>           | 3,62±0,59                           | 3,11±0,07 | p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>2</sub> <0,05 |
| CD19 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>                 | 8,2±0,70                      | 7,69±0,65                  | 4,34±0,41                           | 3,94±0,1  | p <sub>2</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,05 |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> | 3,39±0,18                     | 3,87±0,14                  | 4,19±0,16                           | 4,23±0,06 |                                              |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> | 3,88±0,12                     | 3,72±0,18                  | 3,6±0,17                            | 3,16±0,06 |                                              |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup> | <b>6,32±0,44</b>              | 5,27±0,49                  | 2,9±0,13                            | 2,98±0,64 | p <sub>2</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,05 |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> | 4,19±0,28                     | 3,73±0,22                  | 3,34±0,89                           | 3,31±0,08 |                                              |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> | 3,2±0,14                      | <b>7,24±0,62</b>           | 5,54±0,67                           | 3,34±0,76 | p <sub>1</sub> <0,05                         |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> | 3,87±0,26                     | <b>7,12±0,48</b>           | <b>6,73±0,51</b>                    | 3,18±0,07 | p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,05 |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup> | <b>7,08±0,29</b>              | 3,57±0,15                  | 3,22±0,1                            | 3,12±0,59 | p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,05 |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> | 3,38±0,51                     | 2,96±0,10                  | 3,98±0,19                           | 3,19±0,08 |                                              |
| Показатели спленоцитов, %                           |                               |                            |                                     |           |                                              |
| CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>                 | <b>5,95±0,57</b>              | <b>6,25±0,45</b>           | 2,94±0,24                           | 2,98±0,64 | p <sub>2</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,05 |
| CD19 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>                 | 3,14±0,1                      | 3,54±0,11                  | 3,28±0,15                           | 3,21±0,44 |                                              |
| CD19 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>                 | 5,05±0,86                     | 5,55±1,18                  | 3,66±0,39                           | 3,24±0,66 |                                              |
| CD19 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup>                 | <b>13,74±1,01</b>             | <b>12,41±0,97</b>          | 6,77±1,27                           | 5,06±0,07 |                                              |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> | <b>9,2±0,82</b>               | <b>10,5±0,71</b>           | 6,0±0,18                            | 5,85±0,07 | p <sub>2</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,05 |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> | 5,04±0,16                     | 4,5±0,24                   | 4,09±0,18                           | 4,4±0,06  | p <sub>2</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,05 |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup> | 4,2±0,7                       | 5,0±0,36                   | 3,8±0,42                            | 3,5±0,02  |                                              |
| CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> | <b>8,4±0,89</b>               | 4,34±0,47                  | 3,37±0,17                           | 3,18±0,05 | p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>3</sub> <0,05 |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> | 7,57±0,86                     | <b>12,7±1,18</b>           | 5,54±0,53                           | 5,42±0,13 | p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>2</sub> <0,05 |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> | 3,73±0,2                      | 4,41±0,26                  | 3,29±0,19                           | 3,32±0,07 |                                              |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup> | 3,85±0,2                      | 4,52±0,41                  | 4,48±0,26                           | 3,3±0,08  |                                              |
| CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> | 3,93±0,21                     | <b>9,62±0,01</b>           | 4,16±0,34                           | 3,94±0,76 | p <sub>1</sub> <0,05<br>p <sub>2</sub> <0,05 |

**Примечания:** \* – Показанные результаты являются данными трех независимых экспериментов, каждый с использованием 5-ти отдельных животных в группе. \*\* – достоверность отличий по U-критерию Манна-Уитни между группами мышей, иммунизированных: p<sub>1</sub><0,05 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* SRI-1; p<sub>2</sub><0,05 – *F. tularensis* SRI-1 и *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA; p<sub>3</sub><0,05 – *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ.



**Рисунок 1.** Выживаемость мышей после заражения бактериями *F. tularensis* Schu в дозе 1000 LD<sub>50</sub> (3000 КОЕ) (А) и титры IgG антител к ЛПС *F. tularensis* 15 в крови животных до заражения (В).

был выявлен сопоставимый уровень антител к ЛПС *F. tularensis* (Рис. 1В).

Во всех группах иммунизированных животных наблюдалось количественное и качественное изменение субпопуляций Т- и В-лимфоцитов по сравнению с интактной группой (Таблица 1).

Сравнительный анализ субпопуляций Т-лимфоцитов показал, что на 3 сутки после иммунизации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ у мышей происходила активация Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), о чем свидетельствовало усиление экспрессии CD69 рецептора на их поверхности в селезенке, и CD30 молекулы – в крови. В группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1 наблюдалась активация как Т-хелперов, так и цитотоксических Т-лимфоцитов. А у мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA на 3 сутки иммуногенеза не наблюдалось достоверного увеличения процента CD69<sup>+</sup> или CD30<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. В этой группе мышей было выявлено только увеличение CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> субпопуляции в крови. Уровень экспрессии ко-рецепторной CD28 молекулы увеличивался на Т-хелперах в группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ, и на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов, после иммунизации *F. tularensis* SRI-1.

Анализ субпопуляции В-лимфоцитов показал достоверное увеличение CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> клеток в селезенке и крови мышей, вакцинированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* SRI-1. Было отмечено достоверное увеличение коли-

чества CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток в крови мышей, вакцинированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1, в крови наблюдали увеличение CD19<sup>+</sup>CD30<sup>+</sup> субпопуляции. Уровень экспрессии ко-стимулирующей молекулы CD86 достоверно увеличивался на поверхности В-лимфоцитов, выделенных из селезенки и крови, вакцинированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* SRI-1. На 3-и сутки после иммунизации мышей *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA в популяции В-лимфоцитов изменения уровня экспрессии анализируемых молекул выявлено не было.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наших экспериментов показали, что после иммунизации мышей вакцинным штаммом и его производными, в крови животных появлялись антитела к ЛПС *F. tularensis* и их уровень достоверно не различался между группами. Тем не менее в экспериментах по заражению иммунных мышей высоковирулентным штаммом *F. tularensis* Schu были получены разные уровни выживаемости. Полученные результаты не противоречат литературным данным, свидетельствующим об отсутствии корреляции уровня антител к ЛПС *F. tularensis* с протективной защитой животных от заражения [16, 17].

На моделях мышей и крыс было показано, что защитная способность антител зависит от функциональной активности Т-лимфоцитов [15, 18, 19]. Следовательно, защита, наблюдаемая в этих моделях, свидетельствует о важной

регулирующей роли Т-клеточного звена в формировании протективного иммунитета.

Известно, что в первые 3-е суток после первичного проникновения бактерий формируются реакции врожденного иммунитета, а затем запускаются реакции адаптивного иммунитета. В связи с этим мы оценили уровень активации Т- и В-лимфоцитов в крови и селезенке мышей на 3-и сутки после их иммунизации разными штаммами бактерий *F. tularensis*.

Ранним маркером активации клеток является CD69 рецептор, который играет важную регулируемую роль в переключении неспецифических реакций ИКК на адаптивные, участвует в регуляции эффекторной активности лимфоцитов, а также CD69 рецептор отражает презентующую активность антигенпрезентирующих клеток (АПК) [20]. Результаты наших экспериментов показали, что на 3-и сутки после вакцинации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* SRI-1 у мышей в крови и селезенке увеличивалось количество CD69<sup>+</sup> В-лимфоцитов, что позволяет предположить об их активном включении в формирование специфических реакций. В этих же группах мышей увеличивалось количество В-клеток, экспрессирующих CD86 рецептор, что отражает усиление межклеточных взаимодействий. Об усилении межклеточных взаимодействий свидетельствует также повышение уровня CD28 молекулы при иммунизации *F. tularensis* 15 НИИЭГ на поверхности CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, а в группе мышей *F. tularensis* SRI-1 — на поверхности CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток. CD28 рецептор, который связывается с CD80 и/или CD86 рецепторами на АПК, является классической костимулирующей молекулой, участвующей в обеспечении нормального иммунного ответа. Отсутствие межрецепторных взаимодействий с CD28 рецептором приводит к формированию лимфоцитарной толерантности [21].

В группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ, отмечали усиление экспрессии CD25 рецептора на поверхности В-лимфоцитов. Как известно, лигандом CD25 рецептора является ИЛ-2 при связывании которого происходит усиление пролиферативной активности лимфоцитов. По всей видимости, бактерии *F. tularensis* 15 НИИЭГ инициируют пролиферативную активность лимфоцитов раньше остальных штаммов сравнения. В группе мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1 наблюдали повышение экспрессии CD30 рецептора на поверхности В-лимфоцитов, что, вероятно, отражает усиление эффекторной активности клеток, т.к.

появление CD30 молекулы коррелирует с активным синтезом этой клеткой ИЛ-17А [22].

Т-лимфоциты также являются ключевыми медиаторами протективного туляремиального иммунитета [17, 23]. При туляремиальной инфекции важную роль играют и цитотоксические лимфоциты и Т-хелперы. Об этом свидетельствует снижение протективного иммунитета у мышей BALB/c и C57Bl/6 при истощении CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток у иммунных животных до заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* [24]. Результаты наших исследований показали, что после вакцинации *F. tularensis* SRI-1 увеличивалось количество CD69<sup>+</sup>-позитивных клеток в субпопуляциях Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов, а также CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток. После вакцинации *F. tularensis* 15 НИИЭГ в селезенке мышей достоверно увеличивалось количество только CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> клеток и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD30<sup>+</sup> клеток. В группе мышей, вакцинированных *F. tularensis* 15/23—1ΔrecA, увеличивалось только содержание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток в крови.

## ВЫВОДЫ

1. Штамм *F. tularensis* SRI-1 — кандидат в вакцинные — отличается от штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23—1ΔrecA 100% защитой мышей от подкожного заражения высоковирулентным штаммом *F. tularensis* Schu в дозе 3000 КОЕ/мышь.

2. На 30 сутки иммуногенеза уровень титров антител к ЛПС *F. tularensis* практически не отличается между группами мышей, иммунизированными *F. tularensis* SRI-1, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23—1ΔrecA.

3. В ранние сроки иммуногенеза выявлены повышенная активация В-лимфоцитов и цитотоксических лимфоцитов в крови у мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1, в отличие от двух других иммунных групп животных.

4. В селезенке в ранние сроки иммуногенеза выявлено увеличенное содержание активированных цитотоксических лимфоцитов у мышей, иммунизированных *F. tularensis* SRI-1, в отличие от других иммунизированных групп животных.

Работа выполнена в рамках Отраслевой программы Роспотребнадзора.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Олсуфьев Н. Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. «Медицина», Москва, 1975, 192. [Olsufev N. G. Tax-

- onomy, microbiology and laboratory diagnosis of the causative agent of tularemia. "Medicina", Moscow, 1975, 192.]
2. Petra C. F. Oyston. *Francisella tularensis* vaccines. Vaccine 2009, 27 (D48–D51).
  3. Griffin K. F., P.C.F. Oyston, R. W. Titball. *Francisella tularensis* vaccines. FEMS Immunology & Medical Microbiology 2007, 49(3), 315–323.
  4. Conlan J. W., Shen H., Golovliov I., Zingmark C., Oyston P. C., Chen W., House R. V., Sjöstedt A. Differential ability of novel attenuated targeted deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies tularensis strain SCHU S4 to protect mice against aerosol challenge with virulent bacteria: effects of host background and route of immunization. Vaccine 2009, 28(7), 1824–1831.
  5. Медуницын Н. В. Вакцинология. «Триада-Х», Москва, 1999, 272. [Medunitsyn N. V. Vaccinology. «Triada-X», Moscow, 1999, 272.]
  6. Conlan J. W., Shen H., KuoLee R., Zhao X., Chen W. Aerosol-, but not intradermal-immunization with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* protects mice against subsequent aerosol challenge with a highly virulent type A strain of the pathogen by an  $\alpha\beta$  T cell- and interferon gamma- dependent mechanism. Vaccine 2005, 23, 2477–2485.
  7. Jia Q., Horwitz M. A. Live attenuated tularemia vaccines for protection against respiratory challenge with virulent *F. tularensis* subsp. tularensis. Frontiers in cellular and infection microbiology 2018, 8, 154.
  8. Ray H. J., Cong Y., Murthy A. K., Selby D. M., Klose K. E., Barker J. R., Guentzel M. N., Arulanandam B. P. Oral Live Vaccine Strain-Induced protective immunity against pulmonary *Francisella tularensis* challenge is mediated by CD4<sup>+</sup> T Cells and antibodies, including Immunoglobulin A. Clin. Vaccine Immunol 2009, 16, 444–452.
  9. Celli J., Zahrt T. C. Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2013, 3(4), a010314.
  10. Roberts L. M., Powell D. A., Frelinger J. A. Adaptive Immunity to *Francisella tularensis* and Considerations for Vaccine Development. Frontiers in cellular and infection microbiology 2018, 8, 115.
  11. Bakshi C. S., Malik M., Mahawar M., Kirimanjswara G. S., Hazlett K. R., Palmer L. E., Furie M. B., Singh R., Melendez J. A., Sellati T. J., Metzger D. W. An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain. Vaccine 2008, 26(41), 5276–5288.
  12. Мокриевич А. Н. Молекулярно-генетические подходы к исследованию возбудителя туляремии для целей совершенствования диагностики и специфической профилактики. автореферат дис. ... доктора медицинских наук/Моск. науч. – исслед. ин-т эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского МЗ РФ. Оболенск, 2016. [Mokrievich A. N. Molecular genetic approaches to the study of the causative agent of tularemia for the purpose of improving diagnostics and specific prevention. Abstract dis... Doctors of Medical Sciences/Moscow Institute of Epidemiology and Microbiology. G. N. Gabrievskogo Ministry of Health of the Russian Federation. Obolensk, 2016.]
  13. Сотникова М. А., Кравченко Т. Б., Бахтеева И. В., Миронова Р. И., Комбаров Т. И., Мокриевич А. Н., Павлов В. М. Биологические свойства штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена *sodB*, кодирующего железозависимую супероксиддисмутазу. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2016, 15, 5(90), 24–29. [Sotnikova M. A., Kravchenko T. B., Bakhteeva I. V., Mironova R. I., Kombarova T. I., Mokrievich A. N., Pavlov V. M. The Biological Properties of the Strain *Francisella tularensis* 15 NIEG with Decreased Gene Expression *sodB*, Encoding Fe-Dependent Superoxide Dismutase. Epidemiology and Vaccinal Prevention 2016, 15, 5(90), 24–29.]
  14. Ngo T. T., Lenhoff H. M. Enzyme-mediated immunoassay. «Plenum Press», New York and London, 1988, 444.
  15. Гланц С. Медико-биологическая статистика. «Практика», Москва 1999, 459. [Glantz S. Biomedical statistics. «Praktika», Moscow 1999, 459.]
  16. Kirimanjswara G. S., Golden J. M., Bakshi C. S., Metzger D. W. Prophylactic and therapeutic use of antibodies for protection against respiratory infection with *Francisella tularensis*. Journal of immunology 2007, 179(1), 532–539.
  17. Sanapala S., Yu J. J., Murthy A. K., Li W., Guentzel M. N., Chambers J. P., Klose K. E., Arulanandam B. P. Perforin- and granzyme-mediated cytotoxic effector functions are essential for protection against *Francisella tularensis* following vaccination by the defined *F. tularensis* subsp. novicida  $\Delta$ fopC vaccine strain. Infection and Immunity, 2012, 80(6), 2177–2185.
  18. Волох О. А., Шенелев И. А., Фирстова В. В., Храмова Е. М., Авдеева Н. Г., Самохвалова Ю. И., Еремин С. А., Дятлов И. А., Жемчугов В. Е. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса возбудителя туляремии как перспективного компонента химических вакцин. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2007, 3, 16–21. [Volokh O. A., Shepelev I. A., Firsova V. V., Khrankova E. M., Avdeeva N. G., Samokhvalova Yu. I., Eremin S. A., Dyatlov I. A., Zhemchugov V. Y. Evaluation of the immunobiological activity of C-complex agents of tularemia pathogen as a promising component of chemical vaccines. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology 2007, 3, 16–21.]
  19. Mara-Koosham G., Hutt J. A., Lyons C. R., Wu T. H. Antibodies contribute to effective vaccination against respiratory infection by type A *Francisella tularensis* strains. Infection and Immunity 2011, 79(4), 1770–1778.
  20. Vega-Ramos J., Alari-Pahissa E., Valle J. D., Carrasco-Marin E., Esplugues E., Borràs M., Martínez-A C., Lauzurica P. CD69 limits early inflammatory diseases associated with immune response to *Listeria monocytogenes* infection. Immunology Cell Biol 2010, 88(7), 707–715.
  21. Marin N. D., García L. F. The role of CD30 and CD153 (CD30L) in the anti-mycobacterial immune response. Tuberculosis 2016, 102, 8–15.
  22. Guo Y., Sun X., Shibata K., Yamada H., Muta H., Podack E. R., Yoshikai Y. CD30 is required for activation of a unique subset of interleukin-17A-producing  $\gamma\delta$  T cells in innate immunity against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infection. Infect Immun. 2013, 81(10), 3923–3934.

23. Roberts L. M., Crane D. D., Wehrly T. D., Fletcher J. R., Jones B. D., Bosio C. M. Inclusion of epitopes that expand high avidity CD4<sup>+</sup> T cells transforms sub-protective vaccines to efficacious immunogens against virulent *Francisella tularensis*. Journal of immunology 2016, 197(7), 2738–2747.
24. Barrigan L. M., Tuladhar S., Brunton J. C., Woolard M. D., Chen C. J., Saini D., Frothingham R., Sempowski G. D., Kawula T. H., Frelinger J. A. Infection with *Francisella tularensis* LVS clpB leads to an altered yet protective immune response. Infection and immunity 2013, 81(6), 2028–2042.

## COMPARISON OF THE EARLY IMMUNE RESPONSE OF MICE IMMUNIZED BY TULAREMIA VACCINE STRAIN AND ITS DERIVATIVES

© 2019 A. S. Kartseva\*, M. V. Silkina, O. V. Kalmantaeva, R. I. Mironova, V. V. Firstova, V. M. Pavlov, I. G. Shemyakin

\*E-mail: kartseva\_as@mail.ru

Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia

Received: 22.05.2019. Accepted: 27.06.2019

The paper presents comparative data of a specific mice immune response to immunization with *F. tularensis* 15 NIEG and its derivatives: *F. tularensis* SRI-1 or *F. tularensis* 15/23–1ΔrecA. The results of our experiments showed that after immunization of mice with a vaccine strain and its derivatives, antibodies to *F. tularensis* LPS appeared in the blood of animals and their level did not significantly differ between groups. Protection levels of these groups of immune mice against challenge with the highly virulent strain of *F. tularensis* Schu were different. A comparative analysis showed different expression levels of activation markers and co-stimulating molecules were observed on the surface of B and T lymphocytes on day 3 after mice immunization with different strains.

*Key words:* *Francisella tularensis*, vaccine, flow cytometry, lymphocytes, protective immunity

### Authors:

**Kartseva A. S.**, ✉ junior researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

Obolensk, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare. Phone: +74967312084, E-mail: kartseva\_as@mail.ru;

**Silkina M. V.**, junior researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Kalmantaeva O. V.**, Ph.D., researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Mironova R. I.**, researcher, Laboratory of Anthrax microbiology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Firstova V. V.**, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Pavlov V. M.**, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher of the Microbiology laboratory of Tularemia, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Shemyakin I. G.**, Doctor of Biological Sciences, professor, deputy director for Research, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia.