

С.В. Попов, А.В. Степанов, И.В. Нуралова, В.Н. Цыган

## Современный подход к разработке иммунобиологических диагностических препаратов для индикации и идентификации коксииелл и риккетсий

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Рассмотрены иммуотропные эффекты риккетсий и коксииелл – патогенных биологических агентов. Установлено, что микробиологические особенности облигатных внутриклеточных микроорганизмов оказывают влияние на систему цитокинов при иммунном ответе животных-продуцентов. Вследствие этого большинство биоагентов риккетсиозной природы, проникающих в макроорганизм, не проявляют своих иммуногенных свойств. Это является препятствием при получении высокоиммунных сывороток, необходимых для конструирования иммунобиологических диагностических препаратов. Стандартные методы иммунизации, включающие в себя длительные по времени и многократные «напряженные» схемы введения антигенов, позволяют получать иммунные сыворотки только к достаточно иммуногенным микроорганизмам. Применение паравертебральной интрадермальной многоточечной иммунизации при первичной иммунизации животных-продуцентов и рекомбинантного интерлейкина-2 человека при реиммунизации позволяет повысить иммуногенность риккетсиозных антигенов и получить гипериммунные сыворотки с максимальным титром специфических антител.

**Ключевые слова:** адъювант, гипериммунная сыворотка, идентификация, индикация, коксииелла, патогенный биологический агент, риккетсия, флюоресцирующий иммуноглобулин.

**Введение.** Успех выявления патогенных биологических агентов (ПБА), относящихся к особо опасным инфекциям, зависит от своевременного и эффективного проведения мероприятий по отбору и доставке проб, а также индикации и идентификации микроорганизмов надежными реагентными средствами. Ввиду особенностей заражения и протекания инфекции такие микроорганизмы, как риккетсии: *R. prowazekii* (возбудитель эпидемического сыпного тифа), *R. rickettsii* (возбудитель лихорадки Скалистых гор) и коксииеллы: *C. burnetii* (возбудитель лихорадки Ку), являются значимыми в военно-эпидемиологическом отношении [2, 6].

Известно, что для индикации и идентификации ПБА риккетсиозной или коксииеллезной природы «золотым стандартом» является методика флюоресцирующих антител (МФА) и иммуноферментный анализ (ИФА) [6, 8, 9]. Однако известно, что получение гипериммунных сывороток к риккетсиям – основного субстрата для производства иммунобиологических диагностических препаратов (ИДП), реализующих упомянутые методики, является сложной задачей в связи с иммунологическими свойствами этих возбудителей [12, 17].

Несмотря на многообразие схем иммунизации различных животных-продуцентов теми или иными риккетсиозными или коксииеллезными антигенами с целью получения гипериммунных сывороток с максимальным титром специфических  $\gamma$ -глобулинов в них, как правило, не превышал 1:1280–1:2560 в непрямом МФА (НМФА), даже при длительности всего процесса иммунизации 6–8 мес. и более [1].

Это объясняется иммуотропным воздействием риккетсий и коксииелл, обеспечивающим подавление специфического и неспецифического иммунитета и поддерживая тем самым свою персистенцию в макроорганизме [19]. Так, иммуотропный эффект риккетсий группы сыпного тифа и клещевых пятнистых лихорадок проявляется через подавление бласттрансформации лимфоцитов CD8<sup>+</sup> и снижение количества Е-розеткообразующих клеток, а также активацию клеток фагоцитарной системы, стимулирующих процессы синтеза и секреции провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкина (ИЛ)-1- $\alpha$ , ИЛ-6, интерферона- $\gamma$ , хемокинов и снижение продукции противовоспалительных цитокинов, прежде всего ИЛ-2 и ИЛ-12 [10, 12]. Иммуотропное действие коксииелл проявляется проникновением их посредством толл-подобных рецепторов 4 и 2 типов в мононуклеарные фагоциты, где они персистируют в них в виде фаголизосомного образования (вторичной лизосомы) с последующим поражением дендритных клеток и активации продукции провоспалительных цитокинов [13, 15–17, 19]. Следовательно, иммунный ответ организма на риккетсиозные и коксииеллезные антигены, в основном, сопряжен с дисбалансом в системе цитокинов в сторону активации продукции провоспалительных и супрессии продукции противовоспалительных цитокинов. Подобная ситуация может негативно сказываться при иммунизации животных слабоиммуногенными внутриклеточными возбудителями с целью получения гипериммунных сывороток

для последующего их использования в технологии получения риккетсиозных ИДП. Возможно, для ее нивелирования, перспективным может оказаться использование в комбинации с риккетсиозными или коксииеллезными антигенами иммунологических адьювантов из группы рекомбинантных противовоспалительных цитокинов, в частности, рекомбинантного ИЛ-2 [10, 11, 14, 18].

**Цель исследования.** Оценить интрадермальный многоточечный способ аппликации коксииеллезных и риккетсиозных антигенов и адьювантные свойства рекомбинантного ИЛ-2 человека, использованных при иммунизации животных-продуцентов для получения гипериммунных сывороток.

**Материалы и методы.** В исследовании были использованы: *R. prowazekii* (штамм «Брейнль»); *R. sibirica* (штамм «K-I»), имеющий группоспецифическое сродство с *R. rickettsii*; *C. burnetii* (штамм «Желтогорлая мышь-Луга»), полученные из музея микроорганизмов научно-исследовательского испытательного центра (медико-биологической защиты) научно-исследовательского испытательного института (военной медицины) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. Накопление коксииелл и риккетсий проводили на 5–7 суточных развивающихся куриных эмбрионах и беспородных белых мышах массой 16–18 г по стандартной методике [3].

В качестве иммунологических адьювантов использовали полный адьювант Фрейнда (ПАФ), приготовленный по стандартной методике и рекомбинантный ИЛ-2 человека (общество с ограниченной ответственностью «Биотех», Санкт-Петербург) в дозах 250000 МЕ (серия № 0230108); 500000 МЕ (серия № 0230081); 1000000 МЕ (серия № 0230050) по 1 мл в стерильных ампулах.

В качестве животных-продуцентов были использованы кролики-самцы массой 2,5–3,0 кг породы «Шиншилла» в количестве 72 (питомник «Рапполово» Российской академии медицинских наук, Ленинградская область), предварительно разделенные на две равные группы – опытную и контрольную.

Животных контрольной группы иммунизировали культурами *R. prowazekii* (n=12), *R. sibirica* (n=12) и *C. burnetii* (n=12) по стандартной производственной методике. Первичная иммунизация состояла из двух внутримышечных инъекций 10% суспензии соответствующих живых микроорганизмов в ПАФ в соотношении 2:3 (0,5 и 0,75 мл) с интервалом 7 сут. Через 120 сут осуществляли повторную иммунизацию (реиммунизацию) упомянутыми антигенами, которые вводили внутривентрально четырехкратно с интервалом 3 сут в возрастающих дозах (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мл). Через 14 сут после реиммунизации производили тотальный забор крови от иммунизированных животных по общепринятой методике [3]. Титр специфических антител определяли с использованием НМФА.

При первичной иммунизации опытной группы кроликов 10% суспензии живых *R. prowazekii* (n=12), *R. sibirica* (n=12) и *C. burnetii* (n=12) в ПАФ в соотношении 2:3 (0,5 и 0,75 мл) вводили паравентрально интрадермально в 40 точек однократно. Реиммунизацию проводили корпускулярными антигенами для реакции связывания комплемента (РСК) в концентрации не менее 4 комплементсвязывающих единиц через 45 сут в краевую вену уха. При этом антигены вводили также в возрастающих дозах (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мл) четырехкратно с интервалом между инъекциями 3 сут. Одновременно подкожно вводили рекомбинантный ИЛ-2 в различной дозе (250000, 500000 и 1000000 МЕ/мл), в связи, с чем перед повторной иммунизацией каждая из групп опытных животных была разделена на три равные по численности подгруппы. Спустя 14 сут после последнего введения антигена при реиммунизации от всех кроликов опытной группы проводили тотальный забор крови аналогичный животным контрольной группы. Титр специфических антител определяли с использованием НМФА.

Статистическую значимость различий в сравниваемых выборках оценивали при помощи непараметрического критерия Манна – Уитни для независимых выборок. Накопление базы данных и ее информационно-аналитическую переработку, вычислительные операции и графическое изображение результатов исследований осуществляли на персональном компьютере с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2010 для Windows 7. Математическое обеспечение решения задач исследования проводили также с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 for Windows. Критический уровень достоверности (p) нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий) принимали менее 0,05.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что после первичной иммунизации *C. burnetii* максимальные титры специфических антител в сыворотке крови животных регистрировались на 21 сут при использовании обеих схем иммунизации – стандартной и предлагаемой (рис. 1).

Выраженность специфического антительного ответа у кроликов была практически одинаковой и составила 1:640 (320÷640). В дальнейшем происходило их постепенное снижение до уровня 1:20 (20 40), причем менее длительно у кроликов, которым антигенный материал вводили паравентрально интрадермально в 40 точек. Скорость иммунного ответа в данном случае связана, очевидно, с тем, что высвобождение небольших количеств антигена из многих участков происходит значительно быстрее и с более полной иммунорезорбцией, чем освобождение большого объема антигена из одного участка.

Дополнительный барьер лимфоидной ткани, ассоциированной с кожей, обеспечивает более эффективное доведение антигенного материала до иммуногенной формы и, как следствие этого, даль-

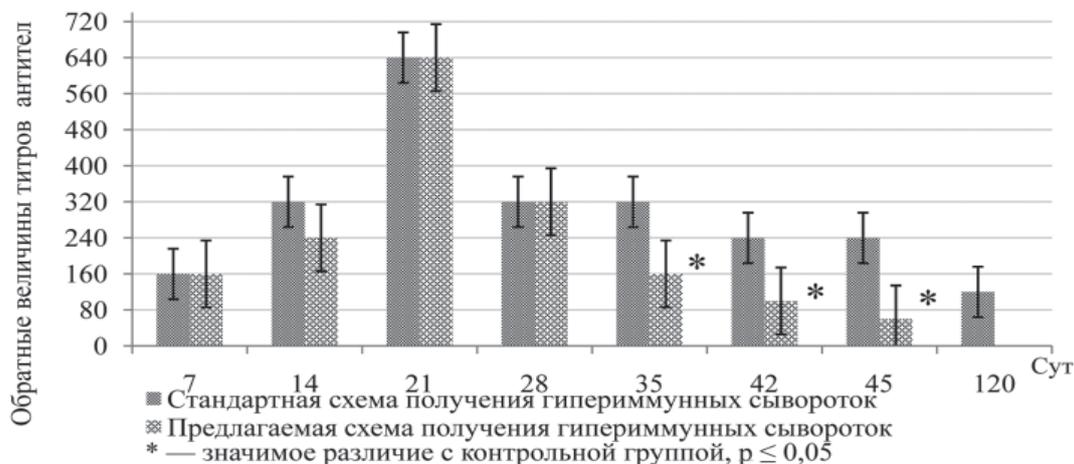


Рис. 1. Динамика накопления специфических антител в опытной и контрольной группах животных-продуцентов после первичной иммунизации *C. burnetii*

нейшему формированию взаимодействия с иммунокомпетентными клетками. Последнее, по-видимому, способствует более эффективному формированию В-клеток памяти и снижению титров специфических иммуноглобулинов, что является определенным сигналом для осуществления реиммунизации животных-продуцентов.

Несколько иные закономерности выявлены при серологическом обследовании сывороток крови кроликов после реиммунизации этим же антигеном, проведенной с использованием ИЛ-2 (рис. 2).

Выявлено, что использование ИЛ-2 при повторной иммунизации животных-продуцентов *C. burnetii* способствует повышению их иммуногенных свойств. При этом наилучшие результаты были получены при применении цитокинового препарата в дозе 250000 МЕ/

мл. Титры специфических сывороточных антител находились на максимальном уровне и составили 1:10240 (10240÷10240),  $p < 0,05$ . Применение иммунологического адъюванта в более высокой дозе оказалось менее эффективным при повышении иммуногенности *C. burnetii*, причем его эффект практически отсутствовал когда использованная доза составила 1000000 МЕ/мл, что, по-видимому, неслучайно, поскольку, согласно имеющимся данным доступных информационных материалов, большие дозы применяемых цитокиновых препаратов могут вызвать иммуносупрессию через активацию апоптоза клеток иммунной системы [4, 5, 7]. Практически аналогичные закономерности были выявлены при иммунизации животных-продуцентов с целью наработки гипериммунных сывороток к антигенам *R. prowazekii* и *R. sibirica* (рис. 3).

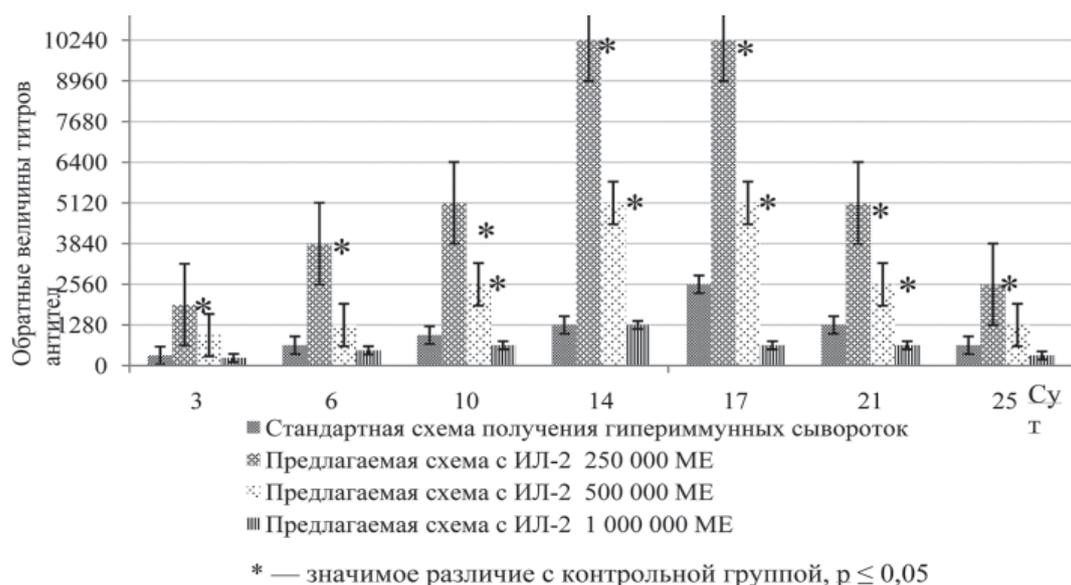


Рис. 2. Динамика накопления специфических антител в сыворотках крови животных-продуцентов опытных и контрольной групп после повторной иммунизации антигенным материалом *C. burnetii*

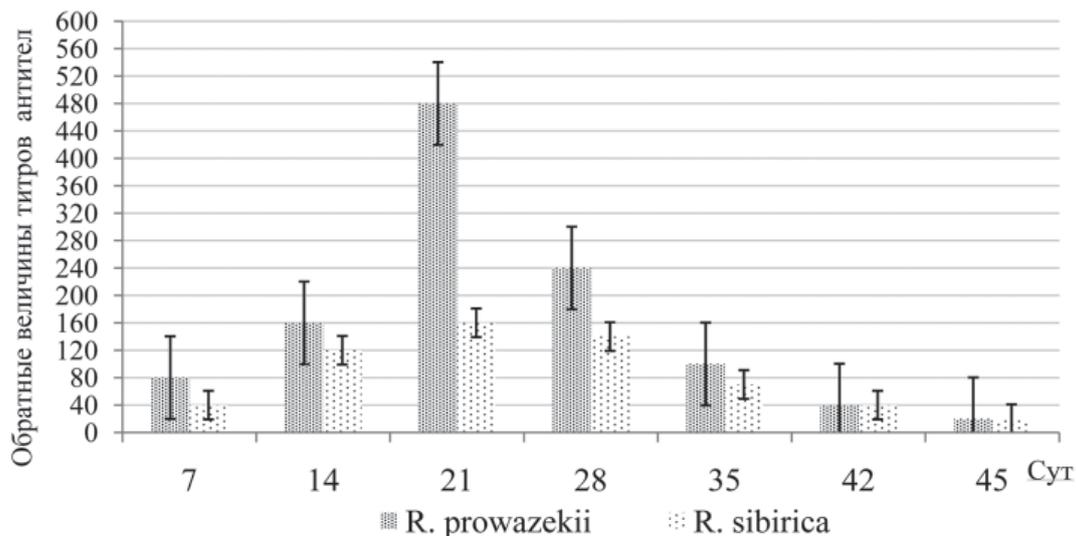


Рис. 3. Динамика накопления специфических антител в сыворотках крови животных-продуцентов в различные сроки после первичной иммунизации *R. prowazekii* и *R. sibirica*

Динамика формирования специфического иммунного ответа у животных после первичной иммунизации *R. prowazekii* и *R. sibirica* практически не отличалась от таковой при аналогичной иммунизации *C. burnetii*, хотя в последнем случае титры специфических антител были несколько более высокими, однако, статистически достоверных различий выявлено не было.

Данное обстоятельство, тем не менее можно отнести к определенному подтверждению имеющегося факта относительно менее выраженных иммуногенных свойств у *R. prowazekii* и *R. sibirica*, чем у *C.*

*burnetii*. В остальном также происходило снижение титров специфических сывороточных антител до 1:20 (10:20), после паравертебральной интрадермальной иммунизации в 40 точек.

Повторная иммунизации антигенами для РСК *R. prowazekii* и *R. sibirica* в дозе не менее 4 комплементсвязывающих единиц четырехкратно в возрастающих дозах (аналогично дозам с использованием в иммунизации *C. burnetii*) в комбинации с ИЛ-2 способствовала существенному повышению эффективности иммунизации (рис. 4).

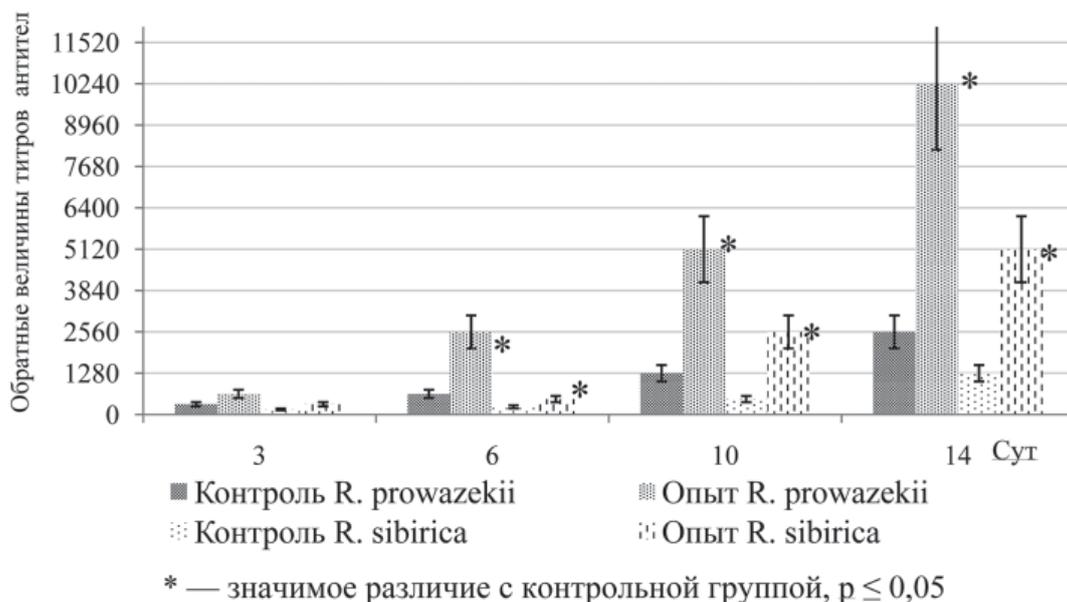


Рис. 4. Динамика накопления специфических антител в сыворотках крови животных-продуцентов после повторной иммунизации антигенными материалами *R. prowazekii* и *R. sibirica*

Величины титров специфических антител к *R. prowazekii* под влиянием ИЛ-2 составили 1:10240 (5120÷10240), в то же время при иммунизации без ИЛ-2 этот показатель составил 1:1280 (1280÷2560), то есть был достоверно ( $p < 0,05$ ) в 8 раз ниже. Аналогичная закономерность была выявлена и в отношении титров специфических антител к *R. sibirica* под влиянием ИЛ-2, уровень которых после реиммунизации составил 1:5120 (2560÷5120) и также достоверно ( $p < 0,05$ ) в 4 раза превышал контрольный уровень 1:1280 (640÷1280).

**Заключение.** Получение гипериммунных сывороток является одним из ключевых этапов при создании практически любого ИДП, разрабатываемого с целью выявления и идентификации биопатогенов. Вместе с тем, нельзя не отметить, что успешность подобных исследований во многом определяется иммуногенностью используемых при этом антигенов. Наиболее эффективными, наравне с используемыми в вакцинопрофилактике иммунобиологическими препаратами на основе аттенуированных штаммов возбудителей инфекций, являются живые микроорганизмы – возбудители инфекционных заболеваний, которые также обладают не всегда высокими иммуногенными свойствами, что во многом обусловлено их генетическими особенностями. Поэтому исследования, посвященные разработке ИДП, в настоящее время сопряжены с поиском эффективных средств с адьювантными свойствами, способными повысить иммуногенные свойства антигенов, используемых при наработке гипериммунных сывороток – ключевого компонента разработки и технологии производства практически любого препарата данного класса. Осуществлена попытка доказать, что функция кожи как цельного иммунного органа, который за счет собственных специфических и неспецифических иммунокомпетентных клеток способен осуществить полноценную презентацию антигенов, путем интрадермальной иммунизации микродозами с ПАФ. При этом также все чаще в качестве иммунологических адьювантов в таких исследованиях используют иммуномодуляторы с избирательным действием на компоненты иммунной системы. Неслучайно, что подобное действие адьювантов рассматривается как основная составляющая поиска эффективных средств повышения иммуногенности антигенов, либо включения их в схемы иммунизации при наработке гипериммунных сывороток к тем или иным антигенам.

К числу перспективных в этой связи препаратов относят рекомбинантные препараты цитокинов, а именно, ИЛ-1, ИЛ-12, фактор некроза опухолей, ряд колониестимулирующих факторов и др. Однако приоритет отдается препаратам на основе ИЛ-2. По-видимому, это совершенно оправдано, поскольку ИЛ-2 принадлежит ключевая роль, как регуляторного фактора адекватной иммунореактивности.

Полученные результаты можно рассматривать в качестве своеобразного обоснования использова-

ния рекомбинантного ИЛ-2 человека при получении гипериммунных сывороток, применяемых в технологии получения риккетсиозных и коксиеллезных ИДП. При этом наиболее целесообразным представляется использование упомянутого препарата на этапе ревакцинации риккетсиозными антигенами в дозе 250000 МЕ/мл. Так, подтверждается эффективность ИЛ-2 в повышении иммуногенности вводимых антигенов для РСК (которые являются менее иммуногенными, чем живые возбудители) при реиммунизации, причем в разы.

Основными преимуществами такой схемы иммунизации является повышение в 4–8 раз иммуногенности риккетсиозных антигенов, сокращение длительности периода между грундиммунизацией и реиммунизацией со 120 до 45 сут (т.е. в 3 раза) и сокращение всего технологического цикла производства ИДП в 2–3 раза по сравнению с существующей на сегодняшний день методологией. Это в определенных ситуациях может оказаться оправданным для проведения в кратчайшие сроки наработки гипериммунных сывороток для создания эффективных ИДП для индикации и идентификации коксиелл и риккетсий МФА или ИФА.

#### Литература

1. Антитела. Методы: кн. 1: пер. с англ. / под ред. Д. Кэтти. – М.: Мир, 1991. – 287 с.
2. Воробьев, А.А. Оценка вероятности использования биоагентов в качестве биологического оружия / А.А. Воробьев // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001. – № 6. – С. 54–56.
3. Здродовский, П. Ф. Учение о риккетсиях и риккетсиозах / П. Ф. Здродовский, Е. М. Голиневич. – М.: Медицина, 1972. – 496 с.
4. Козлов, В.К. Коррекция дисфункций иммунной системы Ронколейкином / В.К. Козлов, М.Ф. Лебедев, В.Н. Егорова // TerraMedica. – 2001. – № 2. – С. 12–14.
5. Козлов, В.К. Коррекция иммунореактивности рекомбинантным интерлейкином-2: пособие для врачей / В. К. Козлов [и др.]. – СПб.: Изд. СПбГУ, 2001. – 24 с.
6. Лобан, К.М. Риккетсиозы человека: руководство для врачей / К.М. Лобан, Ю.В. Лобзин, Е.П. Лукин. – СПб.: Элби, 2002. – 474 с.
7. О целесообразности применения иммуномодуляторов против брюшного тифа / Свиридов Л.П. [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2008. – № 2 (22). – С. 96–97.
8. Опасные инфекционные заболевания: учебное пособие / под ред. В.В. Алексеева – Волгоград: НП «Здоровье и экология», 2006. – 368 с.
9. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: практическое рук. / под ред. Г.Г. Онищенко. – М.: ЗАО «МП Гигиена», 2006. – 288 с.
10. Степанов, А.В. Перспективы применения ронколейкина в качестве адьюванта вакцин / А.В. Степанов [и др.]. – СПб.: Изд. дом, 2006. – 54 с.
11. Эффективность применения дрожжевого рекомбинантного ИЛ-2 при опасных вирусных инфекциях в эксперименте / В.К. Козлов [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2002. – № 2 (8). – С. 35–42.
12. Bechah, Y. A murine model of infection with *Rickettsia prowazekii*: implications for pathogenesis of epidemic typhus / Y. Bechah [et al.] // Microbes. Infect. – 2007. – Vol. 9, № 7. – P. 898–906.
13. Honstetter, A. Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through toll-like

- receptor 4 / A. Honstetter [et al.] // J. immunol. – 2004. – Vol. 172, № 6. – P. 3695–3703.
14. Schaubert, J. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system / J. Schaubert, R.L. Gallo // J. allergy clin immunol. – 2008. – № 122 (2). – P. 261–266.
15. Sauer, J.D. Specificity of Legionella pneumophila and Coxiella burnetii vacuoles and versatility of Legionella pneumophila revealed by coinfection / J.D. Sauer [et al.] // Infect. immun. – 2005. – Vol. 73, № 8. – P. 4494–4504.
16. Steinman, R.M. Taking dendritic cells into medicine / R.M. Steinman, J. Banchereau // Nature. – 2007. – Vol. 449. – P. 419–426.
17. Shannon, J.G. Virulent Coxiella burnetii does not activate human dendritic cells: Role of lipopolysaccharide as a shielding molecule / J.G. Shannon, D. Howe, R. A. Heinzen // Proc. natl. acad. sci USA. – 2005. – Vol. 102, № 24. – P. 8722–8727.
18. The Skin Immune System (SIS): distribution and Immunophenotype of Lymphocyte Subpopulations in normal human skin / J.D. Bos [et al.] // Journal of investigative dermatology. – 1987. – № 88. – P. 569–573.
19. Voth, D.E., Lounging in a lysosome: The intracellular lifestyle of Coxiella burnetii / D.E. Voth, R.A. Heinzen // Cell microbiol. – 2007. – Vol. 9, № 4. – P. 829–840.

S.V. Popov, I.V. Nuralova, A.V. Stepanov, V.N. Tsygan

### The modern approach to the development of immuno-biological diagnostic products for indication and identification of coxiella and rickettsia

**Abstract.** We considered immunotropic effects of the rickettsia and coxiella – pathogenic biological agents. It is established, that the microbiological features of the obligate intracellular microorganisms influence on the system of cytokines in the immune response of the animal-producers. Due to this, most of the bioagents of rickettsia's nature that penetrate into a microorganism do not show their immunogenic properties. This is an obstacle in obtaining hyperimmune serums, necessary for the construction of the immunobiological and diagnostic preparations. Standard methods of immunization, including long-time and repeated «tense» introduction scheme antigens, allow obtaining immune serum only to sufficiently immunogenic microorganisms. The use of paravertebral intradermal multipoint immunization in the primary animal immunization-producers and recombinant interleukin-2 in human reimmunisation allows increasing the immunogenicity of rickettsia's antigens and getting hyperimmune serum with a maximum titer of specific antibodies.

**Key words:** adjuvant, hyperimmune serum, identification, display, coxiella, pathogenic biological agent, rickettsia, fluorescence immunoglobulin.

Контактный телефон: 527-78-39; e-mail: stasikmed@mail.ru