

ИММУНОГЕННЫЕ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

С.И. Жукова, Н.Н. Пивень, И.В. Авророва, О.Б. Прошина,
Н.Г. Плеханова, Н.М. Дрефс, А.В. Засядкина
Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Мелиоидозная инфекция продолжает оставаться одной из серьезных медицинских проблем, актуальных не только для эндемичных районов Юго-Восточной Азии, Северной Австралии и Западной Африки, но и для других районов мира в связи с возможностью завоза инфекции в условиях постоянно развивающихся международных связей и миграции населения. Несмотря на многолетние исследования по разработке мелиоидозной вакцины в России и за рубежом, эффективный профилактический препарат на сегодняшний день отсутствует. Известно, что некоторые поверхностные антигенные комплексы гликопротеиновой природы обладают способностью защищать животных от невысоких заражающих доз возбудителя мелиоидоза [2, 4]. Вместе с тем, недостаточно изученной представляется роль в формировании иммунитета экстрацеллюлярных биологически активных продуктов (антигенов, ферментов, токсинов), накапливающихся в культуральной среде в процессе роста возбудителя мелиоидоза.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить иммуногенные и протективные свойства культуральных фильтратов возбудителя мелиоидоза.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения культуральных фильтратов (КФ) использовали типичные штаммы возбудителя мелиоидоза с полноценной антигенной структурой – 100 и 111 и атипичные штаммы, дефектные по синтезу антигена 8 и некоторых белков наружной мембраны –100–16–1 и 111–6–1. Культивирование проводили в течение 24 ч на бифазной питательной среде, состоящей из агара Хоттингера, на поверхность которого наносили бульон Хоттингера в количестве 15 мл на один матрац. В препаратах КФ изучали активность некоторых ферментов: протеаз, гемолизин, лецитиназы. Ферментную активность КФ определяли на плотных питательных средах с различными субстратами, используя метод диффузии в агаре. В лунки диаметром 3 мм на пластинках агаровой среды вносили по 25 мкл исследуемого КФ в двукратных разведениях и инкубировали чашки при 37° С 24 ч. Использовали полуколичественную оценку ферментативной активности КФ. Результат оценивали в единицах индекса ферментативной активности (отношение диаметра зоны действия фермента к диаметру лунки).

Протективную активность КФ изучали на белых беспородных мышах. Животным вводили препараты КФ в дозах 125, 250 и 500 мкг по белку, подкожно, в смеси с гидратом окиси аммония (до конечной концентрации 1,2 мг/мл). Препараты КФ вводили дважды, с интервалом 10 суток, и через 14 суток после второй иммунизации проводили контрольное заражение животных вирулентной культурой *Burkholderia pseudomallei* C-141.

Для изучения действия КФ на иммунный статус организма их вводили белым мышам подкожно в дозе 250 мкг по белку и через 10 суток определяли следующие показатели иммунитета: титр специфических антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), уровень гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов (ПМ) хемилюминесцентным методом [3]. Для определения уровня специфической ГЗТ мышам вводили внутривожно за 1 сутки до опыта в подушечку левой задней лапки 30 мкг сухих клеток возбудителя мелиоидоза в объеме 0,05 мл, в правую – 0,05 мл физиологического раствора. Одновременно ту же дозу антигена и физраствора вводили интактным животным. Уровень ГЗТ определяли по степени относительного прироста веса лапки, отрезанной по голеностопному суставу, в процентах. Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активность протеаз в КФ исходных типичных штаммов 100 и 111 превосходила таковую в КФ дефектных штаммов (100–16–1 и 111–6–1), при этом протеолитическая активность КФ исходного типичного штамма 111 была выше, чем КФ типичного штамма 100. Все испытанные препараты КФ характеризовались сравнительно низким уровнем лецитиназной активности, кроме КФ штамма 100–16–1 (умеренно выраженная лецитиназная активность). По активности гемолизина КФ штамма 111 (исходного и атипичного) превосходили аналогичные препараты КФ штамма 100. Следует отметить, что КФ варианта штамма 111 с полноценной антигенной структурой обладал более выраженными гемолитическими свойствами, чем КФ дефектного штамма 111–6–1. В табл. 1 приведены результаты изучения влияния КФ на иммунную систему мышей. КФ типичного штамма 111 способствовал формированию наиболее выраженной ГЗТ. Уровни ГЗТ,

Таблица 1

Таблица 2

Влияние мелиоидозных культуральных фильтратов на иммунореактивность мышей

Протективная активность мелиоидозных культуральных фильтратов для мышей

№№ п/п	Препарат	Фагоцитарная активность ПМ (КС)	Уровень ГЗТ (ИР, %)	Титр антител
1.	КФ 100- типич.	23,3 ± 7, 8*	20,6	2560*
2.	КФ 111-типич.	2,5± 0,5	41,0*	320*
3.	КФ100-атипич.	3,2±0,08	25,8*	320*
4.	КФ 111-атипич.	2,2±0,13	26,1*	320*
5.	Контроль (интактные мыши)	4,4±0,08	16,5	0

№№ п/п	Препарат	Доза (мкг)	Летальность при заражении 5 LD ₅₀ <i>B.pseudomallei</i> C-141		
			Пало/ взято	% погибших	СПЖ (сут)
1.	КФ 100-типич.	500	7/11	64	12,6*
		250	6/11	55	15,1*
		125	7/10	70	12,0
2.	КФ 100-атипич.	500	9/11	82	10,4
		250	7/10	70	11,7
		125	8/11	73	8,9
3.	КФ 111-типич.	500	6/12	50	13,8*
		250	5/12	42	14,2*
		125	5/9	56	10,6
4.	КФ 111-атипич.	500	7/11	64	12,0*
		250	8/12	67	11,4
		125	8/10	80	10,6
5.	Контроль (интактные мыши)	–	9/10	90	8,7

Примечание. КС – коэффициент стимуляции; ИР – индекс реакции; * здесь и далее – различия с контролем статистически достоверны (P<0,05).

отмеченные после введения КФ атипичных штаммов, были ниже. КФ типичного штамма 100 был активнее других препаратов в стимуляции фагоцитарной активности мышинных ПМ. Исследование сывороток мышей, иммунизированных КФ, в ИФА показало, что КФ типичных мелиоидозных штаммов стимулировали более высокие титры антител, чем КФ атипичных вариантов.

При изучении протективной активности КФ на мышах было показано, что КФ типичного штамма 111 в дозах 250–500 мкг защищал 50–58 % животных, зараженных 5 LD₅₀ *B.pseudomallei*. Несколько меньшую протективность показал КФ типичного штамма 100. КФ из атипичных штаммов, лишенных антигена 8, были менее протективными, чем КФ полноценных штаммов (30–36 % выживших животных) (табл. 2).

Резюмируя данные по воздействию КФ на иммунную систему, следует отметить, что почти все они оказывали стимулирующее влияние на Т-клеточный иммунитет, что выражалось в формировании ГЗТ. Наиболее активным стимулятором клеточного иммунитета оказался КФ типичного штамма 111. Систему макрофагов наиболее отчетливо стимулировал КФ типичного штамма 100, остальные препараты не обнаружили существенного влияния на фагоцитарную активность ПМ мышей. КФ типичного штамма 100 повышал также активность В-системы иммунитета. Исследование ферментативной активности КФ показало, что исходные штаммы отличались более высоким уровнем продукции протеаз и гемолизина, чем атипичные штаммы. Все препараты оказались слабыми продуцентами лецитиназы. При изучении иммуногенных свойств препаратов было

выявлено, что все они оказывали влияние на клеточный иммунитет, особенно КФ типичного штамма 111. Стимулирующее действие на систему макрофагов обнаружено у КФ типичного штамма 100. Изучение протективных свойств препаратов КФ выявило определенную зависимость защитного действия КФ от уровня продукции протеаз и гемолизина. Более высокие протективные свойства зарегистрированы у исходных штаммов. Они же в большей мере, чем атипичные варианты, стимулировали клеточный иммунитет и систему макрофагов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты могут быть использованы при разработке профилактических препаратов против мелиоидозной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л., 1962. – 180 с.
2. Викторов Д.В. Белковый и антигенный состав штаммов *B.pseudomallei* различной вирулентности: дис. ... канд. биол. наук. – Волгоград, 1997. – 110 с.
3. Любимов Г.Ю., Зенков Н.К., Вольский Н.Н. и др. // Иммунология. – 1992. – № 1. – С. 40–43.
4. Пивень Н.Н. Антигенный состав возбудителей мелиоидоза и сапа в аспектах идентификации, диагностики и патогенности: дис. ... докт. мед. наук. – Волгоград, 1997. – 296 с.

Zhukova S.I., Pyven' N.N., Avrorova I.V., Proshina O.B., Plekhanova N.G., Drefs N.M., Zasyagrina A.V. Immunogenic and protective properties of cultural filtrates from melioidosis causative agents // Vestnik of Volgograd State Medical University. – 2005. – № 3(15). – P. 40–41.

Cultural filtrates were obtained during cultivation of typical strains *B.pseudomallei* of full-valued antigenic structure 100 and 111, and its atypical variants without antigen 8 and some proteins of external membrane. Study of protective properties of CF revealed a certain dependence between protective action of CF and levels of protease and haemolysins production. These strains were more active in stimulating cell immunity and macrophage systems.