

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

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

Для серодиагностики туляремийной инфекции традиционно применяют тесты РНГА и РА. Интерпретация результатов в этих тестах часто затруднена, поэтому существует необходимость совершенствования методов диагностики туляремийной инфекции. Согласно современным представлениям, основную роль в гуморальном иммунитете при туляремии играют антитела против липополисахарида (ЛПС). Однако в некоторых случаях не удается обнаружить антитела к этому антигену, поэтому исследователи ведут поиск других иммунодоминантных антигенов. Нами изучен диагностически значимый рекомбинантный белок GroEL FTT_1696 (FTT_1696), являющийся цитоплазматическим белком шапероном I типа возбудителя туляремии, имеющим высокую иммуногенность и специфичность.

Ключевые слова: туляремия, вакцина, серодиагностика, антитела

Для цитирования: Горбатов А.А., Панферцев Е.А., Баранова Е.В., Соловьев П.В., Комбарова Т.И., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Бикетов С.Ф. Диагностическая значимость рекомбинантного белка GroEL FTT_1696 для выявления противотуляремийных антител. Бактериология. 2017; 2(3): 9–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-9-15

Diagnostic significance of the recombinant protein GroEL FTT_1696 for the identification of antitulematic antibodies

A.A.Gorbatov, E.A.Panfertsev, E.V.Baranova, P.V.Solov'ev, T.I.Kombarova,
G.M.Titareva, T.B.Kravchenko, A.N.Mokrievich, S.F.Biketov

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation

The tests of RNGA and RA are traditionally used for serodiagnosis of tularemia infection. Interpretation of the results is often difficult in these tests, so there is a need to improve methods for diagnosing tularemia infection. According to modern concepts, antibodies against lipopolysaccharide (LPS) play the main role in humoral immunity in tularemia. However, in some cases it is not possible to detect antibodies to this antigen, so researchers are searching for other immunodominant antigens. We studied a diagnostically significant recombinant protein GroEL FTT_1696 (FTT_1696), which is a cytoplasmic protein of type I chaperone of the tularemia pathogen having high immunogenicity and specificity.

Keywords: tularemia, vaccine, serodiagnosis, antibodies

For citation: Gorbatov A.A., Panfertsev E.A., Baranova E.V., Solov'ev P.V., Kombarova T.I., Titareva G.M., Kravchenko T.B., Mokrievich A.N., Biketov S.F. Diagnostic significance of the recombinant protein GroEL FTT_1696 for the identification of antitulematic antibodies. Bacteriology. 2017; 2(3): 9–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-9-15

Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция, вызываемая грамотрицательной коккобациллой *Francisella tularensis*. Высокая инфекционность для человека и

летальность при аэрогенном инфицировании являются причинами отнесения туляремии к особо опасным инфекциям. Широкое распространение природных очагов этого забо-

Для корреспонденции:

Горбатов Алексей Александрович, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: gorbatov1986@mail.ru

Статья поступила 08.08.2017 г., принята к печати 26.09.2017 г.

For correspondence:

Alexey A. Gorbatov, Junior Researcher of the Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: gorbatov1986@mail.ru

The article was received 08.08.2017, accepted for publication 26.09.2017

левания на территории РФ делает актуальным создание современных иммунодиагностических систем для серодиагностики туляремии.

Фундаментальной проблемой серодиагностики инфекционных заболеваний является подбор антигенов, обеспечивающих высокий уровень специфичности анализа с надежным диагностическим критерием инфекционного или поствакцинального процесса.

Как правило, для серодиагностики туляремийной инфекции как у людей, так и у животных в эндемичных районах применяют давно разработанные тесты РНГА и РА [1], в которых используется комплексный туляремийный антиген, представляющий собой взвесь инактивированных бактерий *F. tularensis*. Однако интерпретация результатов в этих тестах часто затруднена, поэтому существует необходимость совершенствования методов диагностики туляремийной инфекции для повышения эффективности выполняемых анализов.

Согласно современным представлениям, основную роль в формировании гуморального иммунитета при туляремии играет липополисахарид (ЛПС) – главный компонент клеточной стенки *F. tularensis* [2–4]. Поэтому большинство современных серотестов для диагностики туляремии разрабатывается с использованием в качестве антигена ЛПС *F. tularensis*. Наличие специфических антител к ЛПС туляремийного микроба является одним из критериев наличия инфекционного или поствакцинального процессов. Однако в некоторых случаях (6–10%) не удается обнаружить антитела к этому антигену, поэтому исследователи ведут поиск других иммунодоминантных антигенов [5, 6]. К настоящему времени выделен ряд белков, перспективных для иммунодиагностики туляремии: пируват дегидрогеназа E2 (FTT_1484), дигидролипоамид сукцинилтрансфераза (FTT_077), белок-шаперон GroEL (FTT_1696), ацетил-СоА карбоксилаза (FTT_0472), гипотетический белок (FTT_1441) и 50S рибосомальный белок L7/L12 (FTT_0143) [7]. Наиболее иммунореактивным из них является белок-шаперон GroEL FTT_1696.

Антиген FTT_1696 является цитоплазматическим белком шапероном I типа GroEL возбудителя туляремии. На локализацию белка *F. tularensis* указывают как результаты биоинформативных расчетов [8], так и экспериментальные исследования по иммунизации лабораторных животных. Результаты биоинформативного поиска, проведенного по базе данных белковых последовательностей NCBI методами blastp и PSI-BLAST, показали, что белок FTT_1696 специфичен для рода *Francisella* [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q5NEE1.1>]. Предполагается, что этот белок участвует в защите клеточных белков от денатурации. Под воздействием различных стрессовых факторов (высокая температура, гипоксия, ультрафиолетовое облучение, изменение pH среды, изменение молярности среды, действие токсичных химических веществ, тяжелых металлов и т.д.) в клетках усиливается синтез белков теплового шока, в том числе GroEL FTT_1696. Имея высокое сродство к гидрофобным участкам частично денатурированных белков, они могут препятствовать их полной денатурации и восстанавливать нативную конформацию белков. Таким образом, в связи с данными исследований, показавших высокую иммуноген-

ность белка FTT_1696, а также отсутствие гомологии с белками бактерий других родов данный белок представляет значительный интерес как целевой антиген для серодиагностики туляремии.

Цель работы – изучить диагностическую значимость рекомбинантного белка FTT_1696 для выявления противотуляремийных антител при инфекционном и вакцинальных процессах.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовано 8 штаммов *F. tularensis* 4 подвидов: *F. tularensis* subs. *tularensis* (Schu, A-Cole), subs. *holarctica* (503, A-1045, 15НИИЭГ), subs. *mediaasiatica* (120, A-678) и subs. *novicida* (Utah112) и 3 штамма гетерологичных микроорганизмов *L. pneumophila*, *B. abortus*, *E. coli* из музея живых культур «ГКПМ-Оболensk». Все исследования с вирулентными и вакцинными штаммами выполнялись в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами [9, 10]. Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37°C на плотной питательной среде FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ). Штамм *B. abortus* культивировали при температуре 37°C на плотной питательной бруцеллагар (ФБУН ГНЦ ПМБ). Штамм *E. coli* культивировали при температуре 37°C в жидкой и на плотной питательной среде LB (Himedia Laboratories Pvt. Limited, Индия).

Получение бактериальных лизатов. Лизаты термоинaktivированных клеток для иммунологических исследований получали с помощью ультразвукового дезинтегратора BANDELIN Sonopuls 3200. Взвеси микробов с концентрацией 5×10^9 м.к./мл обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут при +5°C.

Животные. В экспериментах с животными, одобренными комиссией по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ [11, 12], были использованы мыши инбредных линий BALB/c(H2d) (6–8 недель, масса 18–20 г), крысы линии Wistar (5–7 недель, масса 20–24 г), морские свинки (5–7 недель, вес 350–450 г) и кролики породы Шиншилла (5–7 недель, масса 1500–2000 г).

Кроликов породы Шиншилла иммунизировали подкожно вакцинным штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ с неполным адьювантом Фрейнда в соотношении 1 : 1 дозой 5×10^3 КОЕ, а также для иммунизации использовали рекомбинантный белок FTT_1696 в дозе 20 мкг с неполным адьювантом Фрейнда в соотношении 1 : 1.

Мышей иммунизировали подкожно суспензией клеток *F. tularensis* 15НИИЭГ (30 КОЕ). Через 28 дней после вакцинации мышей заражали вирулентными штаммами *F. tularensis* (*F. tularensis* subs. *holarctica* 503, *F. tularensis* subs. *holarctica* 1045, *F. tularensis* subs. *mediaasiatica* 678, *F. tularensis* subs. *mediaasiatica* 120 в дозе 1×10^3 КОЕ).

Крыс Wistar и морских свинок иммунизировали подкожно однократно в дозе 1×10^3 КОЕ/животное вакцинным штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ. Затем заражали вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 (subs. *holarctica*), *F. tularensis* 678 (subs. *mediaasiatica*) и *F. tularensis* Schu (subs. *tularensis*) в дозе 1×10^6 КОЕ.

Кроме того, кроликов и крыс заражали вирулентными штаммами без предварительной иммунизации: кроликов – штаммами *F. tularensis* 503, 1045 (subs. *holarctica*), 678, 120

(*subsp. mediaasiatica*) в дозе 1×10^6 КОЕ; крыс – штаммами 503, 678 и Schu (*subsp. tularensis*) в дозе 1×10^5 КОЕ.

Получение сывороток

Забор крови у кроликов проводили на 3, 7, 14, 21 и 26-е сутки после иммунизации.

У мышей, крыс и морских свинок забор крови проводили на 28-й день после вакцинации и через 28 дней после заражения.

Кровь от больных туляремией людей ($n = 6$) получали на 14–28-й день заболевания. От пациентов, вакцинированных живой туляремийной вакциной ($n = 160$), забор крови проводили на 28-й день после вакцинации.

Сыворотки из полученной крови выделяли общепринятым методом, разделяли на аликвоты и хранили при -18°C до использования.

В качестве контрольных сывороток использовали нормальные (неиммунные) сыворотки человека, кролика, крысы, морской свинки и мыши.

Получение рекомбинантного белка FTT_1696

Поиск нуклеотидной и аминокислотной последовательности FTT_1696 (Chaperonin GroEL) проводили с использованием баз данных на портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Поиск аналогов целевых генов и белков проводился с помощью алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов проводились с помощью пакета программ Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation).

Очищенный фрагмент ДНК размером 1635 п.о. обрабатывали рестриктазами NdeI + XhoI и лигировали с предварительно обработанной этими же рестриктазами векторной плазмидной ДНК pET32b (Novagen). Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5 α . Отбор трансформантов проводили на плотной питательной среде LA, содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Для подтверждения нуклеотидной последовательности клонированного гена FTT_1696 было проведено секвенирование гена с использованием праймеров к T7 промотору и T7 терминатору векторной плазмиды pET32b. Полученной рекомбинантной плазмидной ДНК pETFTT1696 трансформировали компетентные клетки *E. coli* B121(DE3).

Экспрессию белка FTT_1696 проводили в клетках рекомбинантного штамма *E. coli* B121(DE3)/pETFTT1696 по методике фирмы-производителя (Novagen) в жидкой среде LB в присутствии 50 мкг/мл ампициллина и 1мМ ИПТГ в течение 4 ч при 37°C . Экспрессию рекомбинантного белка FTT_1696 детектировали при помощи вестерн-блот анализа с использованием моноклональных антител к полигистидиному домену гибридного белка.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури-Фолина [13].

Масс-спектрометрия

Подлинность рекомбинантного белка FTT_1696 проверяли методом масс-спектрометрии. Анализируемые белки разделяли электрофоретически. Гидролиз белков 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 ис-

пользованием капиллярной колонки с обращенной фазой C18 (размер частиц 2,6 мкм, пор – 100 Å).

Элюируемые пептиды анализировали на масс-спектрометре Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Германия). Ионизацию проводили методом электрораспыления. Фрагментацию ионов проводили методом диссоциации, активированной соударением. Полученные массы пептидов и спектры фрагментации анализировали с помощью программы PeaksStudio 7.5.

Электрофорез в денатурирующих условиях

Степень чистоты рекомбинантного белка FTT_1696 и состав микробных лизатов клеток оценивали путем разделения белков в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по Laemmli (Laemmli U.K. 1970).

Иммуноферментный анализ

ЛПС туляремийного микроба и рекомбинантный белок FTT_1696 тестировали в ИФА с сыворотками животных и человека. Анализ проводили по стандартной методике [14]. В качестве антигена, сорбированного на планшет, использовали FTT_1696, ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации 1 мкг/лунку. Антивидовые конъюгаты к IgG использовали по методике производителя.

Иммуноблоттинг

Лизаты микробных клеток и рекомбинантный белок FTT_1696 тестировали при помощи иммуноблоттинга [15]. Электроперенос белков осуществляли на нитроцеллюлозную мембрану Hybond C полусухим методом.

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 по одному из антигенов: ЛПС *F. tularensis* и рекомбинантный белок FTT_1696. На полученных тестах проводили анализ сывороток от животных и человека в разведении 1/20.

Результаты и обсуждение

В ходе данных работ получен штамм-продуцент *E. coli* B121(DE3)/pETFTT1696, который содержал в составе экспрессирующего вектора pET32b (Novagen USA) фрагмент ДНК *F. tularensis*, размером 1635 п.о., кодирующий синтез белка FTT_1696 с молекулярной массой 58 кДа.

Рекомбинантный белок, выделенный на металло-хелатном сорбенте, представлял собой гибридный белок с полигистидиновым доменом (his-6) молекулярной массой около 58 кДа. Анализ белка FTT_1696 с помощью электрофореза показал, что он практически свободен от примесей других белков: чистота препарата по белку составила 95–98%, молекулярная масса – 58 кДа (рис. 1, 2).

Масс-спектрометрический анализ показал, что полученный рекомбинантный белок гомологичен белку GroEL FTT_1696 из штаммов различных подвидов *F. tularensis*.

Анализ термоллизатов биомассы штаммов каждого из подвидов *F. tularensis subs. tularensis* (Schu, B-399 A-Cole), *subsp. holarctica* (503, A-1045), *subsp. mediaasiatica* (120, A-678) и *subsp. novicida* (Utah112) показал, что белковый профиль из

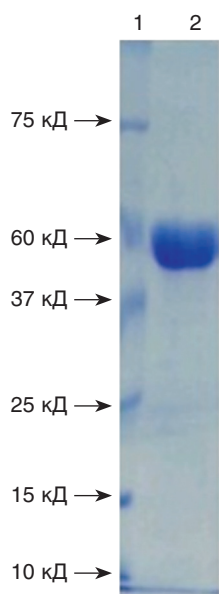


Рис. 1. Электрофореграмма рекомбинантного белка FTT_1696: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – белок FTT_1696.



Рис. 2. Иммуноблот препарата рекомбинантного белка FTT_1696 с антителами к his(6)-домену.

клеток всех вирулентных штаммов не отличался от препарата из вакцинного штамма (рис. 3). Анализ белка FTT_1696 и термолизатов штаммов *F. tularensis* с гипериммунной кроличьей сывороткой к рекомбинантному белку FTT_1696 позволил выявить наличие специфических антител к этому белку с молекулярной массой около 58 кД, а также к белку аналогичного молекулярного веса в спектре белковых профилей всех исследованных штаммов *F. tularensis* (рис. 4). В качестве контроля были использованы образцы термолизатов, приготовленные из биомассы *B. abortus*, *E. coli*, в которых не были обнаружены иммунореактивные белки.

Оценку иммунологической активности белка FTT_1696 проводили методом ИФА с сыворотками крови вакциниро-

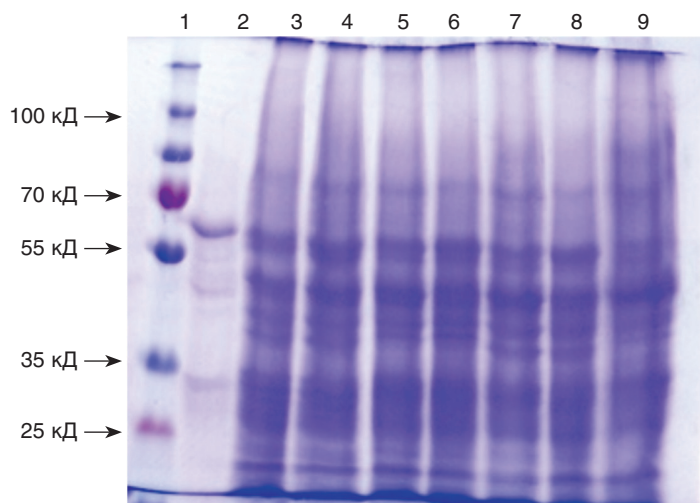


Рис. 3. Электрофореграмма рекомбинантного белка FTT_1696 и термолизатов бактериальных клеток штаммов *F. tularensis*: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – белок FTT_1696; 3 – *F. tularensis* Schu; 4 – *F. tularensis* A-Cole; 5 – *F. tularensis* 503; 6 – *F. tularensis* A-1045; 7 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ; 8 – *F. tularensis* 120; 9 – *F. tularensis* 678.

ванных против туляремии людей ($n = 160$). Данные ИФА показали, что 50% исследуемых сывороток имели специфические титры антител к FTT_1696 в разведении от 1 : 400 до 1 : 600. Эти же сыворотки были исследованы на наличие специфических антител к ЛПС *F. tularensis*. В среднем титры специфических антител к FTT_1696 были в 2–3 раза ниже, чем к ЛПС. У 6% исследуемых сывороток не удалось обнаружить специфических антител к туляремийному ЛПС, однако были обнаружены специфические антитела к FTT_1696, в то время как 10% сывороток с отрицательными титрами к белку имели специфические антитела к ЛПС. В сыворотках крови людей, перенесших туляремийную инфекцию, были обнаружены специфические антитела как к ЛПС *F. tularensis*, так и к белку FTT_1696 в диагностически значимых титрах.

В связи с тем, что имеющаяся выборка материала, полученного от людей, больных туляремией, была мала, мы моделировали течение туляремийной инфекции на животных. Нами были исследованы сыворотки крови экспериментальных животных – кроликов, крыс, морских свинок, мышей. В качестве отрицательного контроля были использованы сыворотки животных, не имевших контакта с возбудителем туляремии.

Изучение динамики нарастания титра специфических антител к ЛПС и белку FTT_1696 в сыворотке крови кроликов, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ, проводили методом ИФА. Установлено, что нарастание титра антител у животных к белку FTT_1696 идет одновременно с нарастанием титра антител к ЛПС *F. tularensis*.

На рисунке 5 представлены данные исследования динамики гуморального иммунного ответа кроликов в разные сроки после проведения вакцинации.

Таким образом, показано, что как у людей, так и у животных титр специфических антител к белку FTT_1696 ниже, чем к туляремийному ЛПС, однако его диагностическое значение очевидно.

В таблице представлены данные исследования титров антител к антигенам туляремийного микроба у лаборатор-

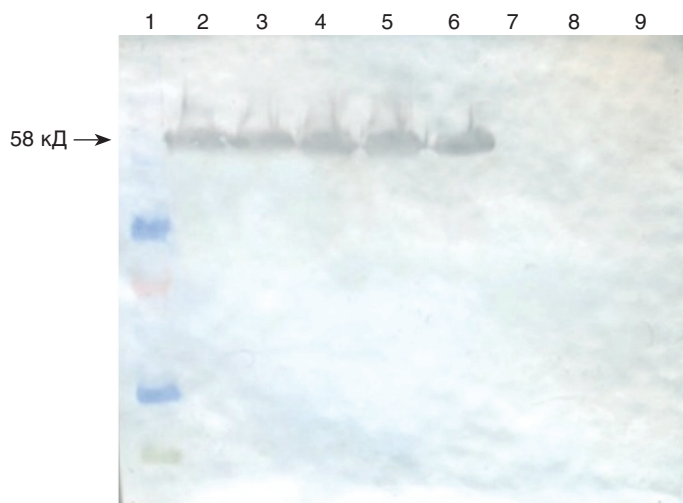


Рис. 4. Иммуноблот гипериммунной кроличьей сыворотки к рекомбинантному белку FTT_1696 с УЗД бактерий: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – белок FTT_1696; 3 – УЗД *F. tularensis* Schu; 4 – УЗД *F. tularensis* 503; 5 – УЗД *F. tularensis* 120; 6 – УЗД *F. tularensis* 15 НИИЭГ; 7 – УЗД *L. pneumophila*; 8 – УЗД *B. abortus*; 9 – УЗД *E. coli*.

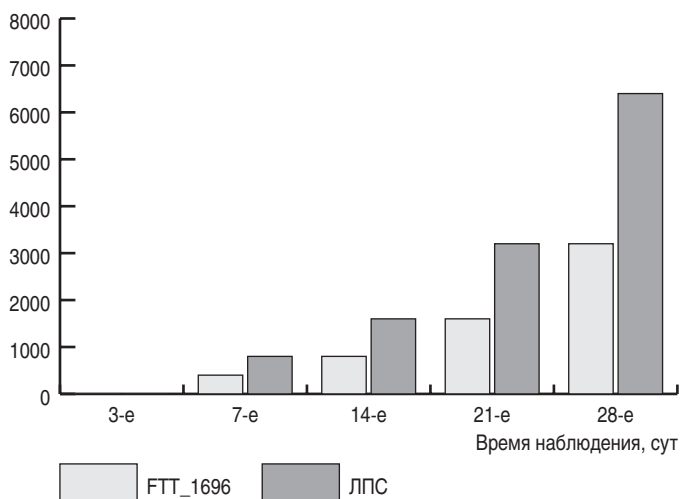


Рис. 5. Динамика нарастания титров специфических антител к антигенам туляремийного микроба у кроликов при иммунизации штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ.



Рис. 6. Лабораторные образцы иммунохроматографических тестов для серодиагностики туляремии. 1 – тест на основе рекомбинантного белка FTT_1696; 2 – тест на основе ЛПС *F. tularensis*.

ных животных при иммунизации и заражении вирулентными штаммами *F. tularensis* разных подвидов.

В экспериментах на лабораторных животных установлено, что специфические антитела к туляремийному ЛПС определялись у 100% иммунизированных и зараженных животных. Антитела к FTT_1696 выявлялись у 70% иммунизированных и зараженных животных. В экспериментах по изучению длительности иммунитета в сыворотках морских свинок и мышей наблюдали сохранение титра специфических антител как к туляремийному ЛПС, так и к белку FTT_1696 вплоть до 180 суток (период наблюдений).

Изготовленные образцы ИХ-тестов были испытаны на выборке сывороток крови данных групп лабораторных животных. Данные иммунохроматографического тестирования сравнивали с данными ИФА. В качестве характеристики количества специфических антител в сыворотке использовали величину ее разведения. В ходе испытаний установлено, что сыворотки, которые по результатам ИФА имели положительную реакцию в разведении 1/400 и выше, при иммунохроматографическом тестировании также показали положительные результаты (рис. 6).

Таким образом, результаты данной работы свидетельствуют о том, что полученный нами рекомбинантный белок

Таблица. Средние значения реципрокных титров антител к антигенам туляремийного микроба у различных лабораторных животных при иммунизации и заражении вирулентными штаммами *F. tularensis* разных подвидов

| Вид лабораторных животных | Иммунизирующий штамм <i>F. tularensis</i> spp. <i>holarctica</i> | Заражающий штамм <i>F. tularensis</i> , <i>subsp.</i> | Реципрокные титры антител к антигенам <i>F. tularensis</i> | |
|----------------------------------|--|---|--|--------|
| | | | FTT_1696 | ЛПС |
| Мыши | контроль | – | отр | отр |
| | 15НИИЭГ | – | 200 | 350 |
| | 15НИИЭГ | A-1045, <i>spp. holarctica</i> | 400 | 1200 |
| | | A-678, <i>spp. mediaasiatica</i> | 600 | 1000 |
| | | 120, <i>spp. mediaasiatica</i> | 600 | 1000 |
| Schu, <i>spp. tularensis</i> | 600 | 700 | | |
| Морские свинки | контроль | – | отр | отр |
| | 15НИИЭГ | – | 400 | 666,6 |
| | 15НИИЭГ | 503, <i>spp. holarctica</i> | 400 | 1200 |
| Крысы | 15НИИЭГ | A-678, <i>spp. mediaasiatica</i> | 400 | 2000 |
| | | – | 400 | 333,3 |
| | 15НИИЭГ | 503, <i>spp. holarctica</i> | 400 | 800 |
| | | A-678, <i>spp. mediaasiatica</i> | 400 | 1200 |
| | | Schu, <i>spp. tularensis</i> | 400 | 2000 |
| | | 503, <i>spp. holarctica</i> | 400 | 1600 |
| | | A-678, <i>spp. mediaasiatica</i> | 400 | 1333,3 |
| 120, <i>spp. mediaasiatica</i> | 400 | 1066,7 | | |
| Schu, <i>spp. tularensis</i> | 400 | 2666,7 | | |
| Кролики | контроль | – | отр | отр |
| | 15НИИЭГ | – | 400 | 6400 |
| | 15НИИЭГ | 503, <i>spp. holarctica</i> | 400 | 6400 |
| | | A-1045, <i>spp. holarctica</i> | 400 | 12800 |
| | | 503, <i>spp. holarctica</i> | 400 | 19200 |
| A-678, <i>spp. mediaasiatica</i> | | 400 | 4266 | |
| – | 120, <i>spp. mediaasiatica</i> | 400 | 5333 | |

F. tularensis FTT_1696 является перспективным иммунодиагностическим антигеном, который наряду с ЛПС *F. tularensis* можно использовать как для иммуноферментного метода при оценке титра специфических антител, так и в ИХ-тестах для ускоренной серодиагностики туляремии.

Литература

1. Сырова НА, Терешкина НЕ, Девдариани ЗЛ. Современное состояние иммунодиагностики туляремии. Проблемы особо опасных инфекций. 2008;3(97):12-5.
2. Cowley SC, Elkins KL. Immunity to francisella. Front Microbiol. 2011 Feb 16;2:26. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00026
3. Fulop M, Mastroeni P, Green M, Titball RW. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of Francisella tularensis. Vaccine. 2001 Aug 14;19(31):4465-72.
4. Fulop M, Manchee R, Titball R. Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from Francisella tularensis in the induction of immunity against tularemia. Vaccine. 1995;13(13):1220-5.
5. Eyles JE, Unal B, Hartley MG, Newstead SL, Flick-Smith H, Prior JL, et al. Felgner Immunodominant Francisella tularensis antigens identified using proteome Proteomics. 2007;7(13):2172-83. DOI: 10.1002/pmic.200600985
6. Twine SM, Petit MD, Fulton KM, House RV, Conlan JW. Immunoproteomics analysis of the murine antibody response to vaccination with an improved Francisella tularensis live vaccine strain (LVS). PLoS One. 2010 Apr 2;5(4):e10000. DOI: 10.1371/journal.pone.0010000
7. Sara LN, Twine KM, Twine SM. The Francisella tularensis proteome and its recognition by antibodies. Front Microbiol. 2011 Jan 7;1:143. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00143
8. Henderson B, Allan E, Coates AR. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. Infect Immun. 2006;74(7):23693-706. DOI: 10.1128/IAI.01882-05
9. СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности». М., 2003.
10. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности». М., 2008.
11. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2010, 48 с.
12. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 №18713) 2010, 22 с.
13. Lowry OH, Rosenbrough NR, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol. J Biol Chem. 1951;193:115-9.
14. Егоров АМ, Осипов АП, Дзантиев ББ, и др. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991, 288 с.
15. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunoblotting: Current status and outlook. J Immunol Methods. 1984 Sep 4;72(2):313-40.

References

1. Syrova NA, Tereshkina NE, Devdariani ZL. Current State of Tularemia Immunodiagnosics. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2008;3(97):12-5. (In Russian).
2. Cowley SC, Elkins KL. Immunity to francisella. Front Microbiol. 2011 Feb 16;2:26. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00026
3. Fulop M, Mastroeni P, Green M, Titball RW. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of Francisella tularensis. Vaccine. 2001 Aug 14;19(31):4465-72.

4. Fulop M, Manchee R, Titball R. Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from Francisella tularensis in the induction of immunity against tularemia. Vaccine. 1995;13(13):1220-5.
5. Eyles JE, Unal B, Hartley MG, Newstead SL, Flick-Smith H, Prior JL, et al. Felgner Immunodominant Francisella tularensis antigens identified using proteome Proteomics. 2007;7(13):2172-83. DOI: 10.1002/pmic.200600985
6. Twine SM, Petit MD, Fulton KM, House RV, Conlan JW. Immunoproteomics analysis of the murine antibody response to vaccination with an improved Francisella tularensis live vaccine strain (LVS). PLoS One. 2010 Apr 2;5(4):e10000. DOI: 10.1371/journal.pone.0010000
7. Sara LN, Twine KM, Twine SM. The Francisella tularensis proteome and its recognition by antibodies. Front Microbiol. 2011 Jan 7;1:143. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00143
8. Henderson B, Allan E, Coates AR. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. Infect Immun. 2006;74(7):23693-706. DOI: 10.1128/IAI.01882-05
9. СП 1.3.1285-03 «Safe handling of microorganisms I–II pathogenicity groups». Moscow, 2003. (In Russian).
10. СП 1.3.2322-08 «Safe handling of microorganisms III–IV pathogenicity groups». Moscow, 2008. (In Russian).
11. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union for the protection of animals used for scientific purposes. St. Petersburg, 2010, 48 p. (In Russian).
12. The order of the health Ministry of the Russian Federation dated 23.08.2010 No. 708н "On approval of Rules for laboratory practice" (Registered in the Ministry of justice 13.10.2010 No. 18713), 2010, 22 p. (In Russian).
13. Lowry OH, Rosenbrough NR, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol. J Biol Chem. 1951;193:115-9.
14. Egorov AM, Osipov AP, Dzantiev BB, et al. Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza [Theory and practice of enzyme immunoassay]. Moscow: "Vysshaya shkola" Publ., 1991, 288 p. (In Russian).
15. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunoblotting: Current status and outlook. J Immunol Methods. 1984 Sep 4;72(2):313-40.

Информация об авторах:

Панферцев Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Баранова Евгения Владимировна, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Соловьев Павел Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Титарева Галина Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Кравченко Татьяна Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Бикетов Сергей Федорович, заведующий отделом иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Information about authors:

Evgeniy A. Panfertsev, PhD, Senior Researcher of the Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Evgenia V. Baranova, PhD, Leading Researcher of the Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Pavel V. Solov'yev, PhD, Senior Researcher of the Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Tatyana I. Kombarova, PhD, Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Galina M. Titareva, PhD, Senior Researcher of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Tatyana B. Kravchenko, PhD, Senior Researcher of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Alexander N. Mokrievich, Dr. Sci., Head of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Sergey F. Biketov, PhD, Head of the Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

НОВОСТИ НАУКИ

Бактерии-хищники против болезнетворных микроорганизмов устойчивых к антибиотикам

Новое исследование показывает, что штамм бактерий способен убивать пневмонию внутри легких больных крыс.

В настоящее время антибиотикоустойчивость патогенных микроорганизмов представляет одну из главнейших угроз для здоровья человека и животных. Ежегодно более 700 тысяч человек умирает от антибиотикоустойчивых штаммов туберкулеза, малярии и ВИЧ/СПИДа. По прогнозам без новых эффективных препаратов против этих быстро мутирующих микробов к 2050 г. смертность от лекарственно-устойчивых инфекций достигнет 50 млн человек в год.

Профессор микробиологии из корейского Национального института науки и техники Роберт Дж. Митчелл (Robert J. Mitchell) (Ulsan National Institute of Science and Technology) занимается поисками и выращиванием так называемых хищных бактерий, которые могут найти и убить невосприимчивых к антибиотикам болезнетворных микроорганизмов непосредственно в организме человека. Первые такие бактерии были идентифицированы учеными в 1962 г. А специально созданные группой Роберта Митчелла бактерии-хищники BALOS (Bdellovibrio-and-like-organisms) или бактерии-вампиры, называемые так из-за их склонности к «высасыванию» внутренностей других бактерий.

Группа Митчелла выявляет естественных бактерий-хищников, специфичных по отношению к определенным видам болезнетворных организмов. «Диета» из одного вида патогенных бактерий усиливает «ориентацию» хищников, позволяет их размножить в количестве, достаточном для введения в организм подопытных животных. До использования этого приема в медицине далеко, в том числе по психологическим причинам. Ученым также не понятны последствия длительного пребывания бактерий-хищников в организме человека. Исследования группы Митчелла продолжаются в рамках программы Pathogen Predators Управления перспективных исследовательских программ Пентагона DARPA.

