

Л.М.Михайлов, Л.Е.Токарева, Н.Л.Баранникова, С.В.Балахонов

## СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА АНТИГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ БРУЦЕЛЛ В S- И L-ФОРМАХ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»,  
Иркутск, Российская Федерация

Известно, что бруцеллы в S-форме вызывают аллергическую перестройку макроорганизма, которая проявляется реакцией гиперчувствительности замедленного типа, эта способность у атипичных вариантов (L-формы) изучена недостаточно.

Показано, что корпускулярный антиген из вакцины *B. abortus* 19ВА и термоэкстракт из *B. abortus* И-206 в S-форме при трехкратной иммунизации вызывают выраженную сенсибилизацию, а корпускулярный антиген и термоэкстракт, приготовленные из бруцелл в L-формах, и термоэкстракт из бруцелл в S-форме при однократном способе введения не оказывают такого действия на лейкоциты белых мышей.

*Ключевые слова:* бруцеллы, S- и L-форма, термоэкстракт, сенсибилизация лейкоцитов, коэффициент лейкоцитолитиза.

L.M.Mikhailov, L.E.Tokareva, N.L.Barannikova, S.V.Balakhonov

### Sensitizing Properties of Antigen Preparations Obtained from Brucella in S- and L-Forms

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

It is known that S-form Brucella causes allergic transformation in a macroorganism, which is manifested as delayed-type hypersensitivity reaction. This capacity in atypical variants (L-forms) is under-investigated. It is demonstrated that corpuscular antigen in *B. abortus* 19BA vaccine and thermoextract prepared from *B. abortus* I-206 in S-form when threefold administered cause marked sensitization; while corpuscular antigen and thermoextract produced from *Brucella* in L-form, and thermoextract from *Brucella* in S-form in case of one time administration do not have such an effect on leucocytes of white mice.

*Key words:* Brucella, S- and L-forms, thermoextract, leukocyte sensitization, leukocytolysis index.

Сущность аллергических процессов при бруцеллезе изучена недостаточно. Считается, что при бруцеллезе ведущее значение имеет аллергия замедленного типа [3]. Выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) необходимо учитывать при проведении специфической профилактики бруцеллеза и изучении иммуногенов различного типа, путей и дозы введения [2].

В настоящее время в литературе имеются немногочисленные данные о способности бруцелл в L-форме вызывать аллергизацию организма. Исследование персистенции бруцелл в L-форме и развитие реакции ГЗТ на модели морских свинок в течение 15 месяцев наблюдения показало, что она не способствовала нарастанию реакции ГЗТ. При заражении морских свинок бруцеллами в L-форме, полученными *in vitro* и *in vivo*, в дозе  $10^6$  м.к. выявлены существенные различия в их вирулентности. Бруцеллы в L-форме, полученные *in vivo*, инфицировали 86 % животных с развитием в отдельных случаях генерализованной формы инфекции, а *in vitro* этот показатель снижался до 42 % с развитием только регионарной инфекции, при этом кожная проба Бюрне у животных во всех случаях была отрицательной. Эритроцитарный диагностикум, приготовленный на основе комплекса антигенов, выделенных из стабильных L-культур, использовали для исследования 2000 сывороток крови людей из

неблагополучных по бруцеллезу пунктов некоторых областей Казахстана. В 60 % случаев с использованием L-антигена получен отрицательный результат, сомнительные и положительные результаты составили по 20 %. Из положительно реагирующих сывороток 5 % выявлено с помощью РХ и РА, 15 – РПГА. При этом установлено, что проба Бюрне позволяет выявлять ГЗТ, обусловленную не только S-, но и L-вариантами бруцелл. Изучение влияния бруцелл в L-форме на аллергическую перестройку, учитывая, что они способны длительное время персистировать в организме человека [4] и животных [6], является актуальным.

Целью работы является определение сенсибилизирующих свойств корпускулярных и растворимых антигенных препаратов, приготовленных из бруцелл в S- и L-формах, на лейкоцитах белых мышей.

### Материалы и методы

В работе использовали инактивированные корпускулярные антигены, полученные из вакцины *Brucella abortus* 19 ВА и *B. abortus* И-206 в L-форме, водорастворимые препараты (термоэкстракты) из *B. abortus* И-206 в S- и L-формах. В качестве биологических моделей использовали 100 белых мышей массой 18–20 г, которых разделили на 8 опытных и 2 контрольные группы по 10 особей в каждой.

Иммунизацию проводили по двум схемам: корпускулярные препараты в дозе  $5 \cdot 10^9$  м.к. в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (1, 2, 3, 4 группы), термоэкстракты (ТЭ) – 0,1 мкг в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (5, 6, 7, 8 группы) вводили внутрибрюшинно однократно и трехкратно с интервалом в 7 сут между инъекциями. Контрольным животным вводили только 0,9 % раствор натрия хлорида по той же схеме (9, 10 группа). Животных гуманным способом выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» 2003 г., Приложением к приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.1977 г. Забор материала (селезенку) для получения лейкоцитов проводили через семь дней после последней иммунизации. Сенсибилизирующие свойства препаратов изучали в реакции лейкоцитолита [5]. Коэффициент лейкоцитолита (КЛ) вычисляли по формуле:

$$КЛ = \frac{МК - МО}{МК} \cdot 100 ,$$

где КЛ – коэффициент лейкоцитолита, МК – количество лимфоцитов в контрольной лунке, МО – количество лимфоцитов в опытной лунке. Полученные результаты оценивали: КЛ до 15 – результат отрицательный или сомнительный, от 16 до 20 – слабopоложительный, от 21 до 30 – положительный, КЛ > 30 – резкоположительный. Ошибку репрезентативности при статистической обработке результатов определяли по И.П.Ашмарину и соавт. [1]:

$$m = \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}} ,$$

где  $m$  – ошибка репрезентативности;  $p$  – соответствующая величина (в %);  $q$  – 100- $p$ ;  $n$  – численность выборки.

### Результаты и обсуждение

Результаты, полученные в ходе эксперимента и вычисления КЛ, представлены на рисунке.

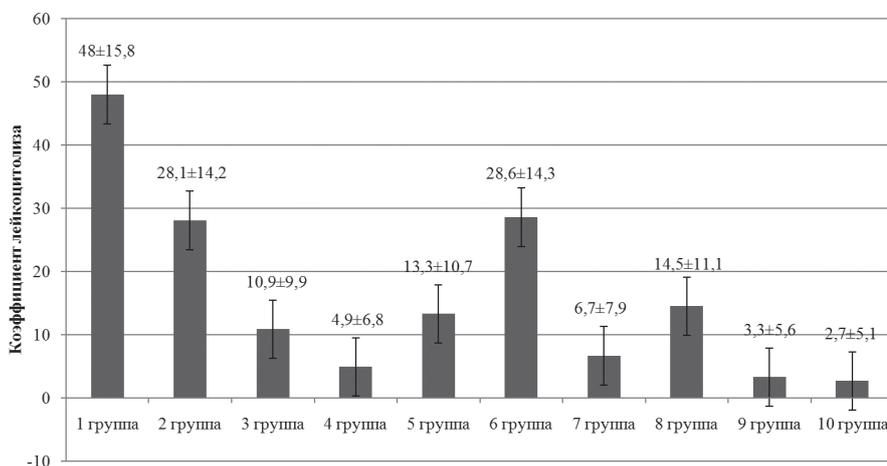
При однократном введении инактивированной корпускулярной вакцины *B. abortus* 19 ВА первой группе экспериментальных животных среднее зна-

чение КЛ составило  $48,0 \pm 15,8$ , реакция оценена как резкоположительная. Во второй группе при трехкратной иммунизации этим препаратом КЛ оставался положительным ( $28,1 \pm 14,2$ ), однако отмечалось его снижение в 1,7 раза по сравнению с первой группой. Корпускулярный препарат из *B. abortus* И-206 в L-форме не вызывает сенсибилизации лимфоцитов белых мышей, которая выражается низкими показателями КЛ при однократном (3-я группа) –  $10,9 \pm 9,9$ , при трехкратном введении антигена (4-я группа) –  $4,9 \pm 6,8$ , но несколько превышающими таковые у интактных (контрольных) животных –  $3,3 \pm 5,6$  (9-я группа) и  $2,7 \pm 5,1$  (10-я группа) соответственно и оцениваемыми как отрицательные.

При однократной или трехкратной иммунизации термоэкстрактом, приготовленным из *B. abortus* И-206 в S-форме, сенсибилизация лейкоцитов, выраженная определением КЛ, составила  $13,3 \pm 10,7$  (5-я группа),  $28,6 \pm 14,3$  (6-я группа) соответственно с оценкой результата как отрицательный и положительный. При иммунизации ТЭ из бруцелл этого же штамма в L-форме КЛ определялся  $6,7 \pm 7,9$  (7-я группа) –  $14,5 \pm 11,1$  (8-я группа) и оценивался как отрицательный или сомнительный.

Из полученных результатов следует, что инактивированный корпускулярный антиген, приготовленный из вакцины *B. abortus* 19ВА (1, 2 группы), и ТЭ бруцелл в S-форме (6 группа) вызывают выраженную сенсибилизацию лейкоцитов селезенки белых мышей, о чем свидетельствует уровень КЛ, оцениваемый как положительный и резко положительный. Однократное применение ТЭ (5-я группа) приводит к слабой сенсибилизации и сомнительному результату КЛ. Корпускулярный антиген и ТЭ из бруцелл в L-форме при обеих схемах иммунизации (однократная или трехкратная) в целом не вызывает существенной аллергической перестройки у белых мышей (3, 4, 7, 8 группы), о чем свидетельствует низкий уровень КЛ в пределах  $6,7 \pm 7,9$  –  $14,5 \pm 11,1$ , что оценивается как отрицательный или сомнительный результат.

Таким образом, корпускулярный антиген и термоэкстракт, приготовленные из бруцелл в L-форме,



Коэффициент лейкоцитолита при иммунизации антигенными препаратами, приготовленными из бруцелл в S- и L-формах:

1-я группа – однократная иммунизация корпускулярным антигеном *B. abortus* 19 ВА; 2-я группа – трехкратная иммунизация корпускулярным антигеном *B. abortus* 19 ВА; 3-я группа – однократная иммунизация корпускулярным антигеном *B. abortus* И-206 в L-форме; 4-я группа – трехкратная иммунизация корпускулярным антигеном *B. abortus* И-206 в L-форме; 5-я группа – однократная иммунизация ТЭ из *B. abortus* И-206 в S-форме; 6-я группа – трехкратная иммунизация ТЭ из *B. abortus* И-206 в S-форме; 7-я группа – однократная иммунизация ТЭ из *B. abortus* И-206 в L-форме; 8-я группа – трехкратная иммунизация ТЭ из *B. abortus* И-206 в L-форме; 9-я группа – однократное введение физиологического раствора (контроль); 10-я группа – трехкратное введение физиологического раствора (контроль)

термоэкстракт из бруцелл в S-форме при однократном введении не оказывают сенсibiliзирующего действия на лейкоциты селезенки белых мышей, что свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения их влияния на организм экспериментальных животных с целью подбора антигенов, обладающих слабым алергизирующим действием.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
2. Бронников В.С. Сенсibiliзирующая активность противобруцеллезных химических вакцин. В кн.: Актуальные проблемы бруцеллеза и туберкулеза животных. Омск; 2000. С. 164–7.
3. Вершилова П.А. Бруцеллез. М.: Медицина; 1972. 439 с.
4. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Борисов В.А., Ходус Ф.И., Гордиенко Л.Н., Ощепков В.Г. Персистенция L-форм бруцелл у человека с хронической формой бруцеллеза. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2009; 5:114–5.
5. Таран И.Ф., Цыбин Б.П., Крылова А.А., Аболина Т.А. Изучение L-форм бруцелл, их ревертантов и исходных культур. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1981; 6:39–43.
6. Триленко П.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Л.: Колос; 1976. 279 с.

#### References

1. Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgis; 1962. 180 p.
2. Bronnikov V.S. [Sensibilizing activity of anti-*Brucella* chemical vaccines]. In: [Actual problems of animal brucellosis and tuberculosis]. Omsk; 2000. P. 164–7.
3. Vershilova P.A. [Brucellosis]. M.: Medicine; 1972. 439 p.
4. Mikhailov L.M., Kalinovskiy A.I., Balakhonov S.V., Shestopalov M.Yu., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Borisov V.A., Khodus F.I., Gordienko L.N., Oshchepkov V.G. [Persistence of *Brucella* L-forms in a person with the chronic brucellosis]. *Zh. Mikrobiol., Epidemiol. Immunobiol.* 2009; 5:114–5.
5. Taran I.F., Tsybin B.P., Krylova A.A., Abolina T.A. [Studying of a role of *Brucella* L-forms, its revertants and stock cultures]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1981; 6:39–43.
6. Trilenko P.A. [Brucellosis in agricultural animals]. L.: Kolos; 1976. 279 p.

#### Authors:

Mikhailov L.M., Tokareva L.E., Barannikova N.L., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

#### Об авторах:

Михайлов Л.М., Токарева Л.Е., Баранникова Н.Л., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 22.05.14.