

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека»

На правах рукописи

Горбатов Алексей Александрович

**Изучение антигенов *Francisella ssp.*, перспективных для использования в
диагностике туляремии**

03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:
д. б. н., Фирстова Виктория Валерьевна
к. б. н., Бикетов Сергей Федорович

Оболенск-2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность исследования	6
Степень разработанности темы исследования	8
Цель исследования.....	10
Задачи исследования	10
Научная новизна исследования	11
Теоретическая и практическая значимость исследования	12
Методология и методы исследования	15
Штаммы микроорганизмов.....	17
Плазмиды.....	18
Животные.....	18
Образцы сывороток.....	19
Микробиологические методы исследования	22
Молекулярно-генетические методы исследования	24
Биохимические методы исследования.....	26
Иммунологические методы исследования	31
Электронная микроскопия.....	34
Биоинформационные и статистические методы исследования	35
Степень достоверности и апробация результатов	36
Личное участие автора в получении результатов	36
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	37
Объем и структура диссертации	38
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	39
1.1 Общие сведения о туляремии	39
1.2 Современное состояние эпидемиологической обстановки по заболеваемости туляремией в Российской Федерации	42
1.3 Развитие иммунного ответа при туляремии.....	46
1.4 Иммунодиагностика туляремии.....	49
1.5 Поверхностные структуры и иммунодоминантные антигены <i>F. tularensis</i>	52
1.6 Заключение по обзору литературы	62
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	65
ГЛАВА 2. ЛИПОПОЛИСАХАРИД ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА –	

УНИКАЛЬНЫЙ АНТИГЕННЫЙ КОМПОНЕНТ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ.....	65
2.1 Сравнительный анализ липополисахаридов клеточной стенки бактериальных клеток <i>F. tularensis</i> различных подвидов (<i>tularensis</i> , <i>holarctica</i> , <i>mediasiatica</i> и <i>novicida</i>).....	65
2.2 Определение иммунологически активных структур в молекуле ЛПС <i>F. tularensis</i> различных подвидов (<i>tularensis</i> , <i>holarctica</i> , <i>mediasiatica</i> и <i>novicida</i>) в реакции иммуноблотинга и дот-блота	67
2.3 Сравнительный анализ гидрофобной и гидрофильной составляющих липополисахарида клеточной стенки бактериальных клеток <i>F. tularensis</i> различных подвидов (<i>tularensis</i> , <i>holarctica</i> , <i>mediasiatica</i> и <i>novicida</i>).....	69
2.4 Изучение методом электронной микроскопии бактериальных клеток <i>F. tularensis</i> различных подвидов (<i>tularensis</i> , <i>holarctica</i> , <i>mediasiatica</i> и <i>novicida</i>) на наличие капсулы	71
2.5 Заключение по Главе 2	73
ГЛАВА 3. БЕЛОК GROEL FTT1696 – ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЙ АНТИГЕН ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА.....	77
3.1 Выявление наиболее иммунореактивных антигенов белковой природы <i>F. tularensis</i>	77
3.2 Клонирование, выделение и очистка рекомбинантного белка FTT1696.....	80
3.3 Анализ наличия белка FTT1696 в препаратах УЗД термолизатов штаммов <i>F. tularensis</i> различных подвидов	83
3.4 Изучение иммунологической активности белка FTT1696 <i>F. tularensis</i>	85
3.5 Заключение по Главе 3.....	90
ГЛАВА 4. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ АНТИГЕНОВ <i>FRANCISELLA SPP.</i> ПРИ ИЗУЧЕНИИ ИММУНИТЕТА ПРИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОМ И ПОСТИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ У ЛЮДЕЙ И ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ	92
4.1 Изучение клеточного иммунитета при вакцинации на мышинной модели туляремии	93
4.1.1 Диагностическая значимость различных антигенов <i>F. tularensis</i> (УЗД, тулярин, КНК, ЛПС Ft, FTT1696) для оценки клеточного иммунитета при вакцинации.....	93
4.2 Оценка антигенов туляремиийного микроба для изучения гуморального	

иммунитета.....	98
4.2.1 Сравнительный анализ иммунодиагностической значимости различных антигенов <i>F. tularensis</i> у людей, переболевших туляремией.....	99
4.2.2 Сравнительный анализ иммунодиагностической значимости различных антигенов <i>F. tularensis</i> при вакцинации.....	102
4.2.3 Сравнительный анализ результатов серологических исследований при мониторинге эффективности вакцинации против туляремии в Алтайском крае.....	104
4.2.4 Особенности диагностической значимости антигенов туляремийного микроба при изучении гуморального иммунитета при поствакцинальном и постинфекционном процессе у лабораторных животных.....	106
4.2.4.1 Изучение гуморального иммунитета у высоковосприимчивых и высокочувствительных животных (мыши линий BALB/c и морские свинки) при вакцинации и заражении вирулентными штаммами разных подвидов.....	107
4.2.4.2 Изучение гуморального иммунитета у высоковосприимчивых, но малочувствительных животных (кроликов породы Шиншилла и крыс линии Wistar).....	110
4.3 Заключение по Главе 4.....	114
ГЛАВА 5. СОЗДАНИЕ И АПРОБАЦИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТОВ С АНТИГЕНАМИ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ СЕРОДИАГНОСТИКИ ТУЛЯРЕМИИ	121
5.1 Разработка и создание иммунохроматографических тестов для выявления специфических антител в сыворотках для диагностики туляремии	122
5.2 Аprobация иммунохроматографических тестов для выявления специфических антител в сыворотках людей и экспериментальных животных для диагностики туляремии	125
5.2.1 Аprobация иммунохроматографических тестов для выявления специфических антител к липополисахариду <i>F. tularensis</i> 15НИИЭГ (ЛПС Ft).....	125
5.2.2. Сравнение чувствительности и специфичности экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуляремийных антител у людей.....	128
5.2.3. Разработка иммунохроматографических тестов для выявления специфических антител к белку FTT1696 и липополисахариду <i>F. novicida</i> U112 (ЛПС Fn).....	132
5.3 Заключение по Главе 5.....	135

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	137
ВЫВОДЫ.....	142
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	143
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	144
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	145
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	147

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция, вызываемая грамотрицательной коккобактерией *Francisella tularensis*. Согласно современным представлениям, этот микроорганизм принадлежит к семейству *Francisellaceae* к роду *Francisella* [88]. Ранее к роду *Francisella* относили два вида: *Francisella tularensis* и *Francisella philomiragia*. В настоящее время род включает и другие виды: *F. halioticida*, *F. hispaniensis*, *F. marina*, *F. noatunensis*, *F. persica* [101]. По принятой в настоящее время международной классификации в пределах вида *F. tularensis* выделяют четыре подвида: *tularensis* (то же, что и *nearctica*) – тип А, распространенный в Северной Америке, *holarctica* (то же, что и *palaeartica*) – тип В, встречающийся в основном в Азии и Европе; *mediasiatica*, ранее считающийся распространенным только на территории Средней Азии, но недавно обнаруженный на Алтае [36, 271], и *novicida*. Наибольшей вирулентностью для человека обладает североамериканский подвид *tularensis* [43]. Штаммы подвида *holarctica* являются менее вирулентными. Степень вирулентности подвида *mediasiatica* некоторыми авторами приравнивается к *novicida* [269]. *F. tularensis* subsp. *novicida* считают условно патогенной для человека – единичные случаи выделения этого подвида от людей касались только лиц со сниженным иммунным статусом [181].

Высокая восприимчивость для человека и значительная летальность (26,8%) [5] при отсутствии мер противодействия является причиной отнесения туляремии к особо опасным инфекциям и потенциальным агентам биологического оружия [190, 205, 215]. Доминирование на территории Российской Федерации лесных и лесостепных ландшафтов с естественными резервуарами возбудителя (многочисленные виды грызунов, лагоморфы) и переносчиками (кровососущие насекомые) обуславливает существование большого количества природных очагов туляремии. Несмотря на

проводимую в эндемичных районах вакцинопрофилактику, ежегодно отмечаются спорадические случаи заболевания среди населения [31]. В последней крупной вспышке в Ханты-Мансийском автономном округе зарегистрировано более 1000 случаев заболеваний человека [8].

Подтверждение диагноза туляремии может быть проведено различными методами: путем выделения чистой культуры возбудителя из клинических образцов, молекулярно-генетическими методами с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также при помощи серологических методов, выявляющих наличие специфических антител к возбудителю туляремии в сыворотках пациентов [155, 262]. Успешное выделение культуры из крови пациентов с бактериемией, как правило, имеет место не более, чем у 10 % пациентов [170]. Зачастую это связано с тем, что клинические образцы получают уже после проведения антибактериальной терапии. В некоторых случаях результаты ПЦР-анализа позволяют обнаружить ДНК возбудителя в отделяемом кожных язв, в конъюнктивальных или глоточных экссудатах, и могут служить доказательством для подтверждения диагноза туляремии [155, 262]. Отсутствие в большинстве медицинских учреждений специализированных ПЦР-лабораторий, имеющих разрешение на проведение работ с бактериальными агентами I-II групп биологической опасности, к которым относится данный возбудитель [237], а также сложность выделения чистой культуры туляремийного микроба лежат в основе того, что постановка диагноза туляремии чаще всего основывается на результатах серологических анализов.

В настоящее время для лабораторного подтверждения клинического диагноза туляремии, согласно методическим указаниям [37], предписывается использовать целый ряд иммунологических исследований: кожная проба с тулярином, реакция лейкоцитолита, реакция непрямой гемагглютинации, реакция агглютинации, метод флуоресцирующих антител, иммуноферментный анализ, реакция нейтрализации антител [37, 64]. Данные

методы для получения результатов требуют наличия специализированного оборудования и занимают от 3 до 18 часов. В Российской Федерации для выявления антитуляреминых антител доступен только один зарегистрированный коммерческий туляреминый серодиагностикум - "РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ" (производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института), однако агглютинационные методы недостаточно чувствительны и могут давать ложноположительные результаты при исследовании сывороток больных некоторыми другими инфекциями, в частности, бруцеллезом [82, 83, 234].

Все это обуславливает актуальность совершенствования серологических методов диагностики туляремии, необходимых как для постановки предварительного диагноза, так и для оценки напряженности поствакцинального иммунитета и проведения эпидемиологического мониторинга в эндемичных районах.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день для серологических исследований в качестве антигенов для обнаружения специфических антител к возбудителю туляремии применяют взвесь инактивированных микробных клеток или очищенный препарат липополисахарида [64, 93, 95, 213, 239, 252].

С начала прошлого века в реакциях агглютинации, используемых для серодиагностики, в качестве антигена используются инактивированные микробные клетки [64, 67, 83, 90, 188, 232]. Для повышения чувствительности их связывают с формализированными эритроцитами [72, 73], латексом [220] или инактивированные микробные клетки непосредственно окрашивают различными красителями (нитросиним тетразолиумом, сафронином) [93]. Такие тест-системы до сих пор находят свое применение в диагностических лабораториях в различных странах, в том числе в Российской Федерации [64, 113, 283].

В последнее время наиболее распространенными форматами серологических тестов для обнаружения специфических антитуляремийных антител в сыворотках крови человека и животных являются иммуноферментный (ИФА) и иммунохроматографический (ИХ) анализы, показавшие себя достаточно эффективными [26]. Однако следует отметить, что в большинстве работ для детекции антител используются экспериментальные серии тестов. Только небольшое количество тестов имеет статус коммерческих: две ИФА тест-системы - «ELISA classic *Francisella tularensis* IgG/IgM» (SERION, Германия), «Anti-*Francisella tularensis* ELISA» (Serazym ELISA) (Seramun Diagnostica, Германия) для детекции всех классов антител, и один ИХ-тест - «VIRapid» (Santa Fé, Испания) [95]. В этих тестах в качестве антигена используют очищенный липополисахарид *F. tularensis*.

Выявление антитуляремийных сывороточных антител служит не только для установления диагноза у больного или переболевшего, но и для оценки иммунологического статуса привитых [39, 37, 252]. В ситуации, когда часть населения, проживающего в эндемичных по туляремии районах, вакцинирована и имеет определенный уровень специфических антител, при интерпретации данных серологических исследований у больных и переболевших пациентов могут возникнуть трудности. Ароновой Н.В. с соавторами (2005) [1, 3] было показано, что специфические антитела, появляющиеся в сыворотке крови у людей, переболевших туляремией, и у кроликов, зараженных вирулентными штаммами, способны связываться как с липополисахаридом *F. tularensis*, так и с липополисахаридом *F. novicida*, в то время как при вакцинации специфические антитела к липополисахариду *F. novicida* отсутствуют.

В последние годы с помощью протеомного анализа и технологии микроэлектронной вычислительной техники ведется поиск белковых антигенов, которые могут иметь иммунодиагностическое значение для оценки гуморального иммунного ответа [164, 165, 201]. В качестве иммунодоминантных антигенов

рассматривается целый ряд белков, среди которых белки FTT0077, FTT0106, FTT1696, FTT0472 и FTT0975 [53,54,164, 165, 201].

Если в практическом здравоохранении в Российской Федерации используются только два теста для оценки клеточного звена иммунитета – кожная проба с тулярином и реакция лейкоцитолита, то в зарубежной практике уже используется тест *in vitro*, основанный на определении уровня индуцированного спленocyтaми синтеза интерферона-гамма в ответ на комплексный туляремийный антиген [95, 213]. До настоящего времени выбор отдельных антигенов или их комплексов, перспективных для использования при оценке клеточных иммунных реакций, не проведен.

Очевидно, что применяемые в практическом здравоохранении в Российской Федерации тест-системы для серодиагностики туляремии требуют совершенствования для соответствия уровню современных тест-систем, используемых за рубежом. При разработке новых эффективных тестов для ускоренной серодиагностики туляремии приоритетными направлениями являются поиск и изучение диагностического потенциала высокоспецифичных антигенов *F. tularensis* и/или их композиций.

Цель исследования

Изучить диагностический потенциал антигенов бактерий *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida* и разработать на их основе иммуно-хроматографические тесты для ускоренной серодиагностики туляремии.

Задачи исследования:

1. Провести информационно-аналитический обзор об иммунологически активных белковых антигенах *Francisella ssp.*
2. С использованием коллекции сывороток, с помощью иммуноблотта выбрать наиболее иммунореактивный белковый антиген, получить его в виде рекомбинантного белка и определить серодиагностический потенциал.

3. Изучить диагностическую ценность липополисахарида *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* с учетом особенностей его химической структуры. Оценить возможность использования липополисахаридов *F. tularensis* (ЛПС Ft) и *F. novicida* (ЛПС Fn) для дифференциации иммунного ответа вакцинированных и переболевших людей.

4. Изучить диагностическую значимость антигенных препаратов *F. tularensis* для оценки клеточного иммунитета на мышинной модели туляремии.

5. Получить набор сывороток крови от различных видов животных, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*, для изучения перспектив использования антигенов FTT1696, ЛПС Ft и ЛПС Fn для серодиагностики туляремии.

6. Создать экспериментальные образцы иммунохроматографических тестов для серодиагностики туляремии на основе полученных антигенов.

7. С использованием коллекции сывороток крови людей и животных после иммунизации и/или заражения штаммами *F. tularensis* провести сравнительную оценку диагностической чувствительности и специфичности экспериментальных образцов ИХ-тестов с доступными коммерческими серодиагностикумами.

Научная новизна

Впервые создан штамм-продуцент *E. coli* BL21\rETFTT1696 для экспрессии рекомбинатного белка FTT1696 *F. tularensis*, клонированного в составе вектора pET32b (Novagen USA).

Впервые установлена специфичность белкового антигена FTT1696 для штаммов *F. tularensis* разных подвидов и показана его диагностическая значимость, что позволяет использовать рекомбинантный белок FTT1696 с

целью создания иммунохроматографических тестов для серодиагностики туляремии.

Получены новые данные о том, что соотношение гидрофильной и гидрофобной частей в препаратах ЛПС штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* коррелирует с толщиной капсульного вещества для штамма каждого подвида, определяемой методом электронной микроскопии.

Получены убедительные доказательства на статистически значимом количестве экспериментальных животных (морские свинки, кролики и крысы), что использование иммунологических тестов на основе липополисахаридов *F. tularensis* и *F. novicida* позволяет дифференцировать гуморальный ответ между вакцинированными и переболевшими.

Выявлено, что при экспериментальной туляремии у мышей линии BALB/с, в отличие от других лабораторных животных (морских свинок, кроликов и крыс), формируется иной тип гуморального иммунного ответа, выражающийся в сниженном уровне титров специфических антител к липополисахариду *F. tularensis* и в отсутствии антител к липополисахариду *F. novicida*.

Впервые показано, что совместное использование трех антигенов: липополисахарида *F. tularensis*, липополисахарида *F. novicida* и рекомбинантного белка FTT1696 в составе иммунохроматографических тестов повышает чувствительность и специфичность серодиагностики.

Теоретическая и практическая значимость

Предложена научная гипотеза, объясняющая феномен серопозитивности сывороток людей и животных, инфицированных вирулентными штаммами *F. tularensis*, в отношении липополисахарида *F. novicida*, отсутствующей в сыворотках вакцинированных. Вероятно, инфицирование вирулентными штаммами, характеризующимися большим

количеством капсульного О-антигена по сравнению с вакцинным штаммом, приводит к индукции антител, распознающих общие для подвидов *F. tularensis* и *F. novicida* эпитопы в О-антигенной части соответствующих липополисахаридов.

Показана целесообразность использования комплексных антигенов туляремиального микроба – тулярина, ультразвукового дезинтеграта и кислотонерастворимого комплекса – в качестве специфических индукторов иммунокомпетентных клеток для оценки напряженности клеточного иммунитета.

Выявлены существенные отличия параметров гуморального иммунного ответа у мышей линии BALB/c при экспериментальной туляремии по сравнению с лабораторными животными других видов.

Определена значимость использования рекомбинантного белка *FTT1696* в качестве дополнительного антигена для серодиагностики туляремии.

Показана возможность комплексного использования очищенных препаратов антигенов ЛПС *F. tularensis*, *F. novicida* и рекомбинантного белка *FTT1696* для серодиагностики туляремии.

В «Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов-Оболенск» депонирован высокопродуктивный штамм-продуцент *E.coli* BL21\pETFTT1696 для экспрессии рекомбинантного белка *FTT1696* (справка № В8363 от 29.01.2018 г.).

Разработаны и апробированы универсальные иммунохроматографические тесты на основе наночастиц золота, конъюгированных с белком G, для обнаружения специфических антител к туляремиальному микробу с тремя антигенами – туляремиальным липополисахарида *F. tularensis*, *F. novicida* и рекомбинантным белком *FTT1696* – для комплексной серодиагностики туляремии у людей и животных.

Созданы, утверждены на учрежденческом уровне и внедрены в практическую работу лабораторий следующие методические рекомендации: «Оценка напряженности специфического клеточного иммунитета у людей к возбудителю туляремии *in vitro*» (одобрены Ученым советом Федерального бюджетного учреждения науки государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ) и утверждены директором, протокол Ученого совета № 8 от 07.10.2011 г.), «Методика оценки напряженности специфического иммунитета к туляремии на мышинной модели при иммунизации потенциальными вакцинными штаммами» (одобрены Ученым советом Федерального бюджетного учреждения науки государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии и утверждены директором, протокол Ученого совета ФБУН ГНЦ ПМБ № 8 от 29.10.2015 г.). Создано практическое пособие «Методы изучения возбудителя туляремии» (Под ред. академика РАН И.А.Дятлова. Авторы: А.Н. Мокриевич, Т.Б. Кравченко, Г.М. Титарева, И.В. Бахтеева, Г.М. Вахрамеева, А.А. Горбатов, И.А. Дятлов, Т.И. Комбарова, П.Х. Копылов, Т.Ю. Кудрявцева, Л.И. Маринин, Р.И. Миронова, А.Н. Сомов, В.С. Тимофеев, Е.А. Тюрин, В.В. Фирстова, Р.З. Шайхутдинова, Н.А. Шишкова. - Оболенск.: ФБУН ГНЦ ПМБ, 2018)

Результаты исследования используются в работе в Центре индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности при Федеральном бюджетном учреждении науки государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии – для исследования сывороток вакцинированных и переболевших туляремией людей, а также сывороток экспериментальных животных для выявления специфических антител к возбудителю туляремии (акт внедрения от 17.01.2018). Материалы диссертации используются в работе испытательного лабораторного центра противочумной станции в Федеральном государственном учреждении здравоохранения «Медико-санитарная часть № 164» с целью выявления

специфических антител к возбудителю туляремии у вакцинированных сотрудников Федерального бюджетного учреждения науки государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, что позволяет повысить достоверность диагностических исследований в случаях отрицательных и сомнительных результатов при тестировании сывороток традиционным методом реакции непрямой гемагглютинации (акт внедрения от 14.02.2018). Результаты исследования используются в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте при выявлении противотуляреминых антител в сыворотках вакцинированных людей при дополнительных диагностических исследованиях, а также в отделе профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов в программах обучения (акт внедрения от 10.02.2018).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована, исходя из современных принципов научного познания, и организована адекватно поставленной цели. Предметом исследования является *F. tularensis*, совершенствование лабораторной серодиагностики туляремии. Анализ научной литературы, посвященной проблеме серодиагностики, проведен на основе формально-логических методов исследования. Планирование и проведение исследований осуществляли на основе общенаучных и специфических методов.

Основными объектами исследования являлись липополисахарид, выделенный из бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*), рекомбинантный белок FTT1696, являющийся аналогом цитоплазматического белка-шаперона I типа возбудителя туляремии, и сыворотки больных и вакцинированных людей, иммунизированных и зараженных лабораторных животных. В работе применяли микробиологические, молекулярно-генетические, биохимические и иммунологические методы исследований. Результаты анализировали при

помощи статистических методов. Работы на животных проводились в соответствии с нормами биоэтики в соответствии ветеринарным протоколом № ВП-2017/2А от 20.06.2017.

В основу дизайна исследования положены три подхода. Первый из них – это изучение антигенов *F. tularensis* различных подвидов; второй – определение их иммунодиагностической значимости; третий – разработка и апробация иммунохроматографических тестов для серодиагностики туляремии.

Материалы

Штаммы микроорганизмов¹

Видовые и родовые названия штаммов микроорганизмов, использованных в работе, принадлежность, источники их получения представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Штаммы микроорганизмов, использованные в работе

№	Вид микроорганизма и номер штамма	Характеристика	Коллекция
1	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 15 НИИЭГ	Вакцинный штамм	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» ФБУН ГНЦ ПМБ
2	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> 503	Природный штамм	
3	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> А-1045	Природный штамм	
4	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> Schu	Природный штамм	
5	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> А-Cole В-399	Природный штамм	
6	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i> 120	Природный штамм	
7	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i> А-678	Природный штамм	
8	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> Utah112	Природный штамм	
9	<i>F. tularensis</i> 15 <i>recA</i>	Вакцинный штамм 15 НИИЭГ с инактивированным геном <i>recA</i>	
10	<i>F. tularensis</i> 15 <i>recD</i>	Вакцинный штамм 15 НИИЭГ с инактивированным геном <i>recA</i> геном <i>recD</i>	
11	<i>L. pneumophila</i> 33215	Природный штамм	
12	<i>B. abortus</i> 19А	Вакцинный штамм	
13	<i>E. coli</i> DH5α	Лабораторный штамм F ⁻ supE44 ΔlacU169 (φ801acZΔM15) hsdR17 (rk ⁻ mk ⁻) recA 19 endAI gyrA96 thi-I elAI	
14	<i>E. coli</i> B121	F ⁻ , ompT, hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cmr	
15	<i>E. coli</i> B121/pETFTT1696	F ⁻ , ompT, hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cmr, pETFTT1696	

¹ Все исследования с вирулентными штаммами, представленные в настоящей работе, выполнялись в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП.1.3.1285-03 "Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности" от 2003 года [61,62].

Плазмиды

Плазмиды, использованных в работе, их характеристика и источник получения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Список использованных в работе плазмид

Плазмида	Характеристики	Источник получения
pET32b	5899 п.н., Ap ^R , плазмида предназначена для клонирования и высокоуровневой экспрессии пептидных последовательностей	Novagen, Cat. No 69016-3

Тулярин

Коммерческий препарат (Омск, ФГУН НПО «Микроген» МЗ РФ) представляет собой взвесь туляремийного микроба вакцинного штамма *F. tularensis* 15НИИЭГ, убитого нагреванием, в растворе изотонического хлорида натрия.

Животные

В экспериментах с животными, были использованы мыши инбредной линии BALB/c(H2^d) (6-8 недель, масса 18-20 г), кролики породы Шиншилла (8-9 недель, вес 2200-2500 г), крысы Wistar (5-7 недель, вес 200-220 г) и морские свинки (5-7 недель, вес 350-450 г). Животные получены из филиала института биоорганической химии питомника «Пушино» и филиала «Андреевка» Федерального Государственного бюджетного учреждения «Научный центр биомедицинских технологий» Российской академии медицинских наук. Работы с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации [23, 49] и Директивой Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [11, 55].

Образцы сывороток

Образцы сывороток, полученные от людей больных или переболевших с установленным диагнозом туляремии и вакцинированных в соответствии с календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям

Венозную кровь от больных туляремией пациентов и вакцинированных живой туляремийной вакциной получали по общепринятой методике с соблюдением правил асептики.

Полученную без антикоагулянтов кровь отстаивали или при комнатной температуре от плюс 15 °С до плюс 20 °С в течение 30-60 мин, или ее помещали в термостат при температуре 37 °С до полного образования сгустка. По окончании образования сгустка пробирки открывали и осторожно проводили тонкой стеклянной палочкой по внутренним стенкам пробирки по окружности в верхнем слое крови для отделения столбика сгустка от стенок пробирки. После ретракции сгустка пробы центрифугировали при центробежной силе от 1000g до 1500g в течение 10 мин при температуре 18-25 °С. После центрифугирования сыворотки отбирали стерильной пипеткой в стерильные пробирки, разделяли на аликвоты и хранили при минус 18 °С до использования. Транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляли в соответствии с методическими указаниями МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией». [37]

Количество образцов сывороток людей, поступивших в Центр индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности при ФБУН ГНЦ ПМБ (п. Оболенск, МО) с целью проведения дополнительных серодиагностических исследований по туляремии, представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Количество образцов сывороток людей, полученных при обследовании больных или переболевших с установленным диагнозом туляремия и вакцинированных в соответствии с календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям

№	Обследуемый контингент	Количество образцов	Год поступления сывороток	Учреждение
1	Больные с установленным диагнозом туляремия	6	2013	ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Ханты-Мансийском АО-ЮГРЕ
		2	2017	ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области
2	Вакцинированные	100	2012	ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области, филиал (Алексинский, Заокский, Ясногорский районы, пос. Новогуровский)
		90	2017	Алтайская противочумная станция, г. Горно-Алтайск
3	Здоровые доноры	15	2012-2017	ЦРБ, Серпухов

Образцы сывороток, полученные от лабораторных животных

Экспериментальные животные были иммунизированы вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и/или инфицированы *F. tularensis* штаммами разных подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*. Манипуляции с животными проводили в специально изолированной комнате для заражений.

Животных иммунизировали и/ или инфицировали подкожно в паховую область, используя для мышей иглы 23G, объем вводимого раствора 0,2 мл; для морских свинок, крыс использовали иглы 25G и объем 0,5 мл. Кроликов иммунизировали подкожно в область холки, используя иглы 25G и объем 0,5 мл. Наблюдение за животными проводили в течение времени необходимого по задачам экспериментов.

У мышей кровь получали из ретроорбитального синуса и помещали в микроцентрифужную пробирку, не допуская при этом вспенивания. От морских свинок кровь получали из краевой ушной вены в микроцентрифужную пробирку, а при тотальном заборе крови морскую свинку подвергали анестезии и проводили забор крови из сердца в центрифужную пробирку. У крыс забор крови проводили из сердца после предварительной анестезии в центрифужную пробирку, не допуская при этом вспенивания. У кроликов получали кровь из краевой ушной вены в центрифужную пробирку. Сыворотку получали аналогично получению сыворотки из человеческой крови.

Количество образцов сывороток лабораторных животных, полученных в ходе проведения экспериментов по иммунизации и инфицированию с целью серодиагностических исследований по туляремии, представлено в таблице 4.

Таблица 4 – Количество образцов сывороток, полученных от лабораторных животных после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и инфицированных штаммами подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*

№	Вид лабораторных животных	Обработка животных	Количество образцов сыворотки
1	мыши	иммунизация	150
		инфицирование штаммами разных подвидов	150
		не обработанные	30
2	морские свинки	иммунизация	40
		инфицирование штаммами разных подвидов	30
		не обработанные	10
3	крысы	иммунизация	30
		инфицирование штаммами разных подвидов	60
		не обработанные	10
4	кролики	иммунизация	5
		инфицирование штаммами разных подвидов	9
		не обработанные	2

Получение гипериммунной сыворотки кролика к белку FTT1696

Для получения гипериммунной сыворотки кроликов породы Шиншилла весом от 1500 до 2000 г иммунизировали живой туляремийной вакциной однократно подкожно в дозе 5×10^9 мл. На 21, 35, 49 день этим кроликам вводили полученный рекомбинантный белок FTT1696 в дозе 0,5 мг/кг с неполным адьювантом Фрейнда в соотношении 1 : 1. Иммунные сыворотки кроликов были собраны через 7 дней после последней иммунизации. Титры специфических антител в сыворотках животных определяли с помощью твердофазного ИФА с использованием в качестве адсорбированного антигена – белок FTT1696.

Микробиологические методы исследования

Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37 °С на плотной питательной среде FT-агаре с черным альбумином (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) с добавлением полимиксина В (AppliChem, Германия) до концентрации 100 мг/л.

Для получения препаратов ЛПС использовали штаммы *F. tularensis* различных подвидов. Бактериальные клетки культивировали на плотной питательной среде (FT-агар) производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk, Россия) при температуре 37 °С в течении 48 часов. Идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим и тинкториальным свойствам. Для получения биомассы культуру смывали с плотной питательной среды и лизировали буфером.

Для получения КНК использовали вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk».

Вакцинный штамм *F. tularensis* культивировали на плотной питательной среде (FT-агар) производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk, Россия) при температуре 37 °С в течении суток, затем пересекали на жидкую питательную среду (FTВ) производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk, Россия)

следующего состава: 2 % ферментативный гидролизат казеина (Россия), 1 % дрожжевой экстракт (Россия), 1,2 % K_2HPO_4 , 1 % глюкоза, 0,001 % цистеин, 0,001 % FeSO_4 , pH 7,2.

Для получения биомассы штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ использовали ферментер емкостью 50 л (ВПУ НПК «Биотест», Россия). Культивирование проводили в течение 9-12 ч до оптической плотности (ОП) культуры, равной 1,8 - 2,0 при длине световой волны 590 нм. Объем биомассы 30 л уменьшали до 5 л, используя установку ультрафильтрации УПЛ-0,6 с мембранами на полых волокнах AP и порогом исключения 100 кДа (ВПУ НПК «Биотест», Россия). Культуру инактивировали добавлением фенола до конечной концентрации 1 % при комнатной температуре в течение 18 ч.

Штаммы *E. coli* DH5 α и BL21 использовали для клонирования белка FTT1696. Бактериальные клетки культивировали при температуре 37 °С в жидкой и на плотной питательной среде LB (HiMedia Laboratories, Индия) [197].

Для проведения клонирования клетки *E. coli* штаммов DH5 α трансформировали лигазной смесью методом «теплового шока». Трансформанты растили на среде Луриа-Бертани (LB, HiMedia Laboratories, Индия) с 50 мкг/мл ампициллина при 37°С. Выделяли рекомбинантную плазмиду и трансформировали химически компетентные клетки *E. coli* штамма BL21, выращивая клетки на среде LB производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk, Россия) с 50 мкг/мл ампициллина при 37°С.

Для оценки экспрессии рекомбинантного белка FTT1696 инокулят из отдельных колоний, трансформированных плазмидой, вносили в пробирки с жидкой среды LA. Культивирование проводили при 37°С на качалке (190 об./мин). По 1 мл ночной культуры засеивали в колбу с жидкой средой, объемом 0,25 л, и культивировали в том же режиме до достижения оптической плотности культуральной жидкости 0,6-0,7 ОД. Биомассу осаждали центрифугированием при 6 000 об/мин в течение 15 мин (Beckman G2-21, Германия). Биомассу дважды отмывали центрифугированием

физиологическим раствором. Наличие белка в лизате культуры клеток *E. coli* подтверждали ДСН - электрофорезом в 10-12% ПААГ, а присутствие полигистидинового тага – в иммуноблоте.

Штамм 33215 *L. pneumophila* культивировали при температуре 37 °С на плотной питательной среде легионелбакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) [17] в условиях CO₂ в течении 24-48 часов. Чистоту бактериальной культуры оценивали по морфологии колоний и тинкториальным свойствам клеток в мазках, окрашенных по Граму.

Штамм *B. abortus* 19ВА культивировали при температуре 37 °С на плотной питательной среде бруцеллагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) в течении 24-48 часов. Чистоту бактериальной культуры оценивали по морфологии колоний и тинкториальным свойствам клеток в мазках, окрашенных по Граму.

Стандартные суспензии бактериальных клеток готовили в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) с использованием стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ НЦЭСМП, Россия).

Молекулярно-генетические методы

Полимеразная цепная реакция

Реакции амплификации фрагментов ДНК проводили с использованием термоциклера Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия). Для ПЦР-амплификации фрагментов использовали коммерческий набор High Fidelity PCR Enzyme Mix (K0191, Thermo Fisher Scientific Inc., США) с ДНК *F. tularensis* в качестве матрицы. Хромосомную ДНК *F. tularensis* 15НИИЭГ добавляли из расчета 100 нг на 25 мкл реакционной смеси. Последовательности праймеров приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Праймеры, использованные для клонирования белка FTT1696

Наименование	Последовательность праймера 5'→3'
В- FTT1696- R	GTAGAATCATATGGCTGCAAAACAAGTTTTATTTTC
В- FTT1696- F	AAGTTGCTCGAGCATCATGCCAGGCATACCG

Параметры ПЦР реакций: 95°C \30 сек. 60° C\30 сек. 72°C\120 сек. - 30 циклов, завершающая элонгация 72°C - 10мин. Продукты ПЦР очищали из агарозного геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (# K0692, Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно протоколу производителя. Лигирование фрагментов ДНК туляремийного микроба и плазмидного вектора pET32b (Novagen, Cat. No 69016-3, США), рестрицированных NdeI и HindIII эндонуклеазами, проводили, используя набор Rapid DNA Ligation Kit (K1422, Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Электрофорез и очистка ДНК

Продукты реакции разделяли электрофорезом в 0,9 % агарозном геле («Sigma» США) в Трис-Борат-ЕДТА буфере (89 mM Трис, 89 mM борная кислота, 2 mM ЕДТА, pH of 10X TBE: 8.3), с последующим окрашиванием бромистым этидием (100 мг/л) [47] и детекцией с использованием трансиллюминатора ЕСХ-15.L при длине волны 365 нм (Vilber Lourmat, Франция). Очистку ПЦР – фрагмента проводили при помощи набора ``DNA Extraction Kit`` (Fermentas, Литва).

Трансформация клеток *E. coli*

Компетентные клетки *E. coli* (штаммов DH5α и BL21) трансформировали химически с использованием набора TransformAid Bacterial Transformation Kit (K2711, Thermo Fisher Scientific Inc., США) методом «теплового шока» в течение 45 сек при 42°C. Трансформанты растили на среде Лурия-Бертани (LB) с 50 мкг/мл ампициллина при 37°C. Определение нуклеотидной последовательности гибридного гена FTT1696 проводили на приборе ABI Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с использованием секвенирующих олигонуклеотидных праймеров, комплементарных нуклеотидной последовательности T7-промотора и T7-терминатора векторной плазмиды pET32b. Выделенной рекомбинантной плазмидой трансформировали химически компетентные клетки *E. coli* штамма BL21-CodonPlus(DE3)-RP методом «теплового шока» в течение 45 сек. при 42°C.

Биохимические методы

Получение ультразвукового дезинтеграта

Бактериальные лизаты получали с помощью обработки взвеси микробов (концентрация 5×10^9 м.к./мл) ультразвуком с использованием ультразвукового дезинтегратора BANDELIN Sonopuls (BANDELIN, Германия) 3200 в течение 15 минут с последующим центрифугированием (5 мин, 10 000 об/мин.).

Получение кислото-нерастворимого комплекса

Для получения кислото-нерастворимого комплекса (КНК) использовали биомассу штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученную на ферментере (АгроМаш, Россия). Культивирование проводили в течение 9-12 ч. Культуру инактивировали добавлением фенола до конечной концентрации 1 % при комнатной температуре в течение 18 ч. Бактериальные клетки после закисления 5 М уксусной кислотой до pH 4,0 и выдерживания в течение 1 ч при температуре 4 °С осаждали центрифугированием. Полученный осадок обрабатывали ДНКазой и ресуспендировали в 0,1 М трис-буфере (pH 7,5). Для удаления примесей из препарата КНК осадок ресуспендировали в 1 мМ растворе ацетата натрия (pH 4,3) и осаждали центрифугированием. Очищенный препарат КНК растворяли в дистиллированной воде и стерилизовали через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Сухой КНК получали, используя сублимационную сушилку.

Методы выделения ЛПС

Выделение ЛПС проводили методом экстракции по Westphal [1965] [286]. Препаративные количества ЛПС выделяли по методу [86].

Для экстракции бактериальные клетки или изолированные структурные компоненты клеточных стенок прогревали при температуре 68 °С в 45 %-ном водном растворе фенола. После охлаждения, для разделения фаз, смесь центрифугировали. В водной фазе содержались водорастворимые компоненты - нуклеиновые кислоты, полисахариды и гидрофильные

молекулы ЛПС, в фенольной фазе содержалась большая часть белков. Нерастворимый материал находился в интерфазе.

Водный раствор, содержащий ЛПС, осторожно отбирали и диализовали против дистиллированной воды в течение 4-х суток, контролируя процесс диализа определением изменения (уменьшения) значения оптической плотности раствора при длине волны 260 нм [287]. После окончания диализа препараты ЛПС лиофилизировали.

Очистку препаратов ЛПС от примесей нуклеиновых кислот проводили с использованием ферментов: ДНК-азы и РНК-азы (Sigma, США). Инкубировали растворы ЛПС при температуре 37 °С в течение 3-18 ч в присутствии трис-НСl до 10 мМоль (рН 7,2), сульфата магния до 10 мМоль, ДНК-азы и РНК-азы до 100 мкг/мл. Процесс гидролиза нуклеиновых кислот контролировали спектрометрически и по окрашиванию бромистым этидием электрофоретически разделенных образцов.

Для очистки препаратов от белковых примесей использовали протеиназу К (Sigma, США) в концентрации от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл, инкубацию вели при температуре 65 °С в течение 3-5 ч. После обработки ферментами проводили диализ препаратов против дистиллированной воды в течение дня со сменой воды каждые 2 ч. Ультрацентрифугирование при 100000 g использовали для заключительной очистки ЛПС, которое проводили не менее 4-х раз, контролируя содержание нуклеиновых кислот в супернатанте по уменьшению оптической плотности при 260 нм. Очищенные препараты ЛПС лиофилизировали.

При необходимости препараты ЛПС очищали от фосфолипидов по методу E. Bligh и W. Dyer (1951) [86]. Для проведения скрининговых исследований ЛПС выделяли микрометодом по P. Hitchcock и T. Brown (1983) [157]. Из суточной культуры микроорганизмов готовили 1 мл суспензии, содержащей 10^{10} кл./мл. Клетки осаждали центрифугированием, суспендировали в 50 мкл лизирующего (sample) буфера, прогревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. К лизату добавляли аликвоту

протеиназы К до 10 мкг/мл, смесь инкубировали в течение 1 ч при температуре 65 °С. Нерастворимые клеточные компоненты осаждали центрифугированием (2 мин, 14000 g). Супернатант использовали для электрофоретического анализа.

Определение примесей в препаратах ЛПС

Электрофоретический контроль препаратов ЛПС проводили по U. Laemmli [179] и О. Остерману [47] в 15 % SDS-ПААГ. Для визуализации ЛПС гели окрашивали аммиачным раствором оксида серебра после окисления йодной кислотой в соответствии с рекомендациями С. Tsai и С. Frash [274]. Для визуализации белковых примесей использовали кумасси R250. Концентрацию белков определяли по М. Bradford [87] или О. Lowry [186]. Содержание нуклеиновых кислот определяли спектрометрически, измеряя оптическую плотность при 260 нм [287], и по окрашиванию препаратов бромистым этидием при электрофоретическом разделении в 0,7 % агарозном геле.

Мягкая кислотная деградация ЛПС

Препараты ЛПС изучаемых штаммов гидролизovali 2 % водным раствором уксусной кислоты при температуре 100 °С в течение 4 ч для разрыва кислотолабильной кетозидной связи между кором и липидом А. Нерастворимый в воде осадок липида А осаждали центрифугированием (13000 g, 20 мин), промывали водой, суспендировали в воде и лиофилизировали. Водорастворимую фракцию из штаммов *F. tularensis* различных подвидов *subsp. tularensis*, (Schu), *subsp. holarctica* (15 НИИЭГ, 503), *subsp. mediasiatica* (A-678) и *subsp. novicida* (Utah112) разделяли с помощью гельпроникающей хроматографии на колонке с гелем Sephadex G-50 (S) (70 × 2,6 см; Amersham Biosciences, Швеция), используя в качестве элюента пиридин-ацетатный буфер (водный раствор 0,4 % пиридина и 1 % уксусной кислоты) и детектируя элюцию с помощью дифференциального рефрактометра («Кнауер», Германия).

Получение рекомбинантного белка FTT1696

Биомассу размораживали и ресуспендировали в 20-кратном объеме связывающего буфера (5 мМ имидазола, 6 М мочевины, 500 мМ NaCl, 20 мМ Трис-Н Cl, pH 7.9) с добавлением 1 мМ PMSF. Дезинтеграцию микробных клеток проводили 10 циклами озвучивания, импульсами 30 сек, с перерывом 30 сек на ледяной бане (Virsonic 100, Канада). Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 15 000 об/мин в течение 20 мин (Beckman G2-21, Германия). Супернатант использовали для выделения целевого белка.

Аффинная хроматография белка FTT1696

Сорбент осторожно ресуспендировали в деионизованной воде и вносили равномерным потоком в колонку (1x10 см), объем геля составил 5-6 см². Сорбент активировали 10-тью объемами 50 мМ NiSO₄ в деионизованной воде. После промывки деионизованной водой (3 объема) колонку уравнивали связывающим буфером (20 мМ Трис-HCl, 5 мМ имидазол, 6 М мочевины, 0,5 М NaCl, pH 7,9) и выдерживали при 4°C 30 мин. Препарат наносили на колонку со скоростью не более 1 мл/мин во избежание проскока очищаемого белка. После промывки колонки связывающим буфером (10 объемов) проводили ступенчатую элюцию белка FTT1696 под контролем спектрофотометра (λ -280 нм). 1 ступень – элюция 60 мМ имидазола + связывающий буфер. 2 ступень – элюция связывающим буфером с 500 мМ имидазола. Фракции, содержащие белок FTT1696, диализовали в течение 12 ч. против буфера: 10 мМ ФБР (2,94 г Na₂HPO₄·12H₂O, 0,6 г NaH₂PO₄·2H₂O, 8,7 г NaCl на 1 л деионизованной H₂O), pH 7,2.

Электрофоретический анализ антигенов

Электрофорез антигенов проводили по методу Лэммли [179] в 10-15% разделяющем полиакриламидном геле в присутствии натрий – додецилсульфата (SDS). Образцы вносили в гель в однократном буфере для образцов (50 мМ Трис-HCl, pH=6,8, 10% глицерин, 2% ДСН, 0,02% бромфеноловый синий, 1% β -меркаптоэтанол). Визуализировали полосы

белков в геле после окраски их PageBlue ProteinStain (Fermentas, Литва). Для визуализации ЛПС гели окрашивали аммиачным раствором оксида серебра после окисления йодной кислотой в соответствии с рекомендациями С. Tsai и С. Frash [274].

Масс-спектрометрия белков

Для подготовки образцов белка для масс-спектрометрического анализа проводили электрофорез образцов с различными дозами нанесений (от 1 до 10 мкл с концентрацией белка 1 мг/мл). После чего вырезали фрагменты геля, соответствующие искомому белку и проводили гидролиз двумя протеазами – трипсином и протеазой К (по отдельности) по общепринятому протоколу. Коротко: кусочки геля 1x1 мм и переносили в микропробирку. Для удаления SDS добавляли 40% MetOH в 5% уксусной кислоте из расчета 150 мкл на кусочек геля. Инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин, промывали водой (150 мкл на кусочек геля). Для отмывки от краски добавляли 50% ацетонитрил в 50 мМ NH_4HCO_3 из расчета 150 мкл на кусочек геля. Инкубировали при 56 °С в течение 20 мин. Для восстановления и алкилирования дисульфидных связей: добавляли 5 мМ бета-меркатозанола в 50 мМ NH_4HCO_3 и инкубировали при 25 °С в течение 30 мин, после чего добавляли 15 мМ йодацетамида, в 50 мМ NH_4HCO_3 . Инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте, после чего промывали водой (150 мкл на кусочек геля). Добавляли ацетонитрил на 10 мин и после его удаления, высушивали на вакуумном концентраторе (5 мин). К высушенным кусочкам геля добавляли раствор протеазы 100-200 мкл (из расчета протеаза/белок= 1/50). Инкубировали 10 мин при 4 °С, сливали раствор протеазы и вносили буфер, для оптимальной работы протеазы – 100 мкл (50 мМ NH_4HCO_3 , рН 7-8). Инкубировали 20 ч при 37 °С, после чего добавили 2 мкл концентрированной ТФУ, обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин. Супернатант переносили в пробирки на

200 мкл и сушили на вакуумном концентраторе. Высушенные пептиды хранили при 4 °С.

Полученные пептиды анализировали методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Смесь гидролизата белка наносили на капиллярную колонку с обращенной фазой C₁₈ с размерами частиц 2,6 мкм и порами 100Å. Длина колонки 100 мм и диаметр 75 мкм. Колонку набивали в лабораторных условиях под давлением 350 атмосфер. Хроматографию пептидов проводили на нанопотоковом хроматографе Easy-nLC1000 (Thermo Scientific, США). В качестве раствора А использовали 0,05% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде, раствор В содержал 90% ацетонитрила и 0,05% муравьиной кислоты. Профиль элюции был следующий: 90 мин градиента от 100% А до 70% В, 15 мин до 100% В, скорость потока 200 нл/мин.

Элюируемые пептиды анализировали на масс-спектрометре Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Ионизацию проводили методом электрораспыления (EP). Фрагментацию ионов проводили методом диссоциации активированной соударением (ДАС). Полученные массы пептидов и спектры фрагментации анализировали с помощью программы PeaksStudio 7,5 (peaksblog.bioinfor.com).

Иммунологические методы

Оценка клеточного иммунитета по уровню синтеза гамма-интерферона лимфоцитами иммунизированных мышей.

Специфический клеточно-опосредованный иммунитет, по уровню пролиферативной активности лимфоцитов и по продукции IFN-γ в супернатанте спленоцитов после стимуляции иммунокомпетентных клеток антигенами *F. tularensis in vitro*.

В качестве источника Т-лимфоцитов использовали суспензию спленоцитов мышей. Мышей эвтаназировали ингаляцией CO₂, затем стерильно вскрывали брюшную полость и изолировали селезенку. Селезенку стерильно гомогенизировали через капроновый фильтр в среду РПМИ-1640,

дважды центрифугировали полученную суспензию спленоцитов при 250 g по 10 мин, ресуспендировали в полной питательной среде на основе RPMI-1640 (10 % ФС, 2мМ глутамин, 5 мМ меркаптоэтанол, 20 мкМ Непес), до конечной концентрации 5×10^6 клеток/мл. Для оценки специфического клеточного ответа к спеленоцитам в среду культивирования вносили различные антигены туляремийного микроба – тулярин, ультразвуковой лизат *F. tularensis* 10^8 КОЕ, кислото-нерастворимый комплекс *F. tularensis* (КНК) и препараты ЛПС *F. tularensis* 15НИИЭГ (ЛПС Ft), и рекомбинантный белок *F. tularensis* 1696 (FTT1696). Митоген конканавалин А (Sigma) в концентрации 5 мкг/мл применяли в качестве положительного контроля. Спленоциты культивировали при 37° С, 5 % CO₂ и 100 % влажности течение 72 ч, отбирали супернатант и определяли в нем уровень синтеза гамма-интерферона иммуноферментным методом используя наборы фирмы eBioScience (Австрия) согласно инструкции.

Иммуноблот [18]

Антигены из полиакриламидного геля электрофоретически (TE70XP, Hoefer, США) переносили на нитроцеллюлозную мембрану (кат. № 10600003, Amersham Biosciences, Швеция) при силе тока 200 мА в течение 60 мин. Дальнейшие процедуры отмывки и инкубации мембраны с реагентами проводили при температуре 37 °С на ротационном шейкере при 150 rpm (ST-3L, ELMi Ltd., Латвия). Мембрану инкубировали в растворе ФСБ, содержащем 5 % обезжиренного молока (кат. № 170-6404, BIO-RAD, США) в течение 40 мин. Далее проводили отмывку мембраны в течение 5 мин раствором ФСБ-Т (ФСБ, содержащий 0,1% твин-20 (кат. № 194841, Sigma, США), и инкубировали 1 час в растворе (1:100) сыворотки крови. После этапа отмывки (трижды по 5 мин) мембрану инкубировали 40 мин в растворе антител к антивидовым иммуноглобулинам, конъюгированным с пероксидазой хрена. После отмывки (трижды по 5 мин) мембрану помещали в раствор субстратной смеси (0,05 % диаминобензидина, 0,015 % перекиси

водорода, 0,01 М ФБР (рН 7,4). Результаты регистрировали через 5-10 мин, останавливая реакцию промыванием мембраны в дистиллированной воде.

Иммуноферментный анализ [18, 26, 92].

Планшеты для проведения анализа (Nunc, MaxiSorp, Дания) в течение ночи при температуре 4 °С сенсibilизировали раствором антигена (5 мкг/мл - 0,1 мл/лунка) в 0,01 М натрий-карбонатном буфере (рН 9,6). Планшет промывали однократно ФСБ-Т (0,2 мл/лунка) с использованием автоматической системы отмывки «Проплан» (Пикон, Россия). Дальнейшие процедуры инкубации планшета с реагентами проводили при температуре 37°С на ротационном шейкере при 150 грт. Для блокирования участков неспецифической сорбции в лунки планшета приливали раствор 5 % обезжиренного молока в ФСБ и инкубировали в течение часа. После трехкратной промывки планшет инкубировали 1 ч с сыворотками крови в объеме 0,1 мл/лунка и в разведении 1/50 с двухкратным шагом титрования. Каждый образец сыворотки вносили в двух повторах. Отмытый планшет инкубировали в течение 30 мин в растворе рабочего разведения антител к антивидовым иммуноглобулинам, конъюгированным с пероксидазой хрена (0,1 мл/лунка). После четырехкратной отмывки в лунки планшета добавляли 0,1 мл свежеприготовленного субстратного раствора (0,2 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, 0,03% перекиси водорода). Ферментативную реакцию останавливали после развития окраски (через 15 мин) добавлением в лунки планшета 0,05 мл 1 М серной кислоты и регистрировали оптическую плотность раствора при длине волны 492 нм с помощью планшетного фотометра «Униплан» (Пикон, Россия).

В качестве референсной системы была использована коммерческая иммуноферментная тест-система для количественного определения туляремийных IgG человека - «ELISA classic *Francisella tularensis* IgG» (SERION, Германия).

Радиальная иммунодиффузия (Оухтерлони)

Детекцию антител проводили методом радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони. В 1% агарозной гелевой пластинке в центральную лунку вносили белок FTТ1696, а в радиально расположенные на расстоянии 6-10 мм лунки - исследуемую сыворотку. Диффундируя навстречу друг другу, при наличии антител в сыворотке, в определенной периферической лунке формировалась полоса преципитации между нею и центральной лункой (двойная диффузия) в течение 18-24 ч.

Для постановки РНГА использовали диагностикум "РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ" (серия 1-17, срок годности до 02.2018) производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института (Россия), согласно инструкции производителя.

Электронная микроскопия

Подготовку и обеззараживание взвесей туляремийного микроба проводили в соответствии с МУ 1.3.3103-13 «Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов 1-4 групп патогенности». Агаровую культуру *F. tularensis* суспендировали в 1-2 мл 2,5 % глутаральдегидного фиксатора (рН 7,5-8,5) и доводили до концентрации, равной 10 ЕД отраслевого стандартного образца мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (ОСО 42-28-59-85П). Взвесь микроорганизмов инкубировали в течение 2 ч при температуре 4 °С. На сетку, с обращенной вверх пленкой-подложкой, наносили 1 каплю обеззараженной взвеси микроорганизмов. После минутной экспозиции избыток жидкости с поверхности сетки удаляли фильтровальной бумагой. После высушивания на поверхность сетки наносили 3-4 капли 1 % осмиевого фиксатора и инкубировали 1-1,5 мин при комнатной температуре. Затем на сетку наносили 2-4 капли 0,1 моль/л какодилатного буфера, затем 2-4 капли дистиллированной воды для удаления солей буферного раствора. Избыток жидкости с поверхности сетки удаляли фильтровальной бумагой. На

поверхность сетки наносили 1 каплю раствора для негативного контрастирования (1-2% раствор натриевой соли фосфорно-вольфрамовой кислоты, 1-2% раствор уранилацетата, раствор ацетата и молибдата аммония) на 1-3 мин. Избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой, сетки высушивали на воздухе 10-15 мин.

Просмотр клеток проводили на микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN (разрешающая способность 70А°, рабочее напряжение 120 кV). Обработку изображений, осуществляли с помощью программы Tecnai Imaging Analysis.

Биоинформационные и статистические методы

Поиск нуклеотидной и аминокислотной последовательностей FTT1696 (Chaperonin GroEL) проводили с использованием баз данных на портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Поиск аналогов целевых генов и белков проводили с помощью алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили с помощью пакета программ VectorNTI 10.0.1. (InvitrogenCorporation).

Идентификацию иммунодоминантных белков *F. tularensis* проводили масс-спектрометрическим анализом с использованием программы PeaksStudio 7,5.

Для статистического анализа результатов использовали общепринятые методы статистической обработки данных, описанные в книге С. Гланца «Медико-биологическая статистика» [7], а также программы Microsoft Office Excel (Microsoft, США). Каждую пробу исследовали в трех повторах, эксперименты повторяли, по меньшей мере, дважды. Результаты были представлены как средняя величина \pm стандартное отклонение. Уровни значимости (P) для вероятности 95% были определены с использованием критерия Стьюдента *t* с помощью статистических программ, встроенных в

программу Windows Excel. Стандартные отклонения $P < 0,05$ считали статистически значимыми.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности результатов работы свидетельствует использование современных методов исследования, которые характеризуются высокой чувствительностью, объективностью. Использование указанных методов позволило разработать усовершенствованный подход, который позволяет проводить серодиагностические исследования на туляремию ускоренным методом с хорошей степенью достоверности.

Диссертация апробирована на межлабораторной научной конференции ФБУН ГНЦ ПМБ (протокол № 52 от 28 марта 2018 г.).

Результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на 3 международных и Всероссийской конференциях: 1-ой Международной конференции по инфекционным заболеваниям и наномедицине (Непал, Катманду, 2012); Международном симпозиуме по опасным заболеваниям (Австрия, Вена, 2014); Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств – членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Россия, Сочи, 2015); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные заболевания» (Россия, Сочи, 2017).

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации, осуществлялось на всех этапах работы и выразилось в анализе и обобщении литературных данных, разработке дизайна научного исследования и выполнении всего объема микробиологических, биохимических и серологических исследований. Автор лично провел

статистическую обработку и анализ полученных данных, проанализировал полученные результаты, сформулировал выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Основная часть экспериментальных работ была проведена на базе ФБУН ГНЦ ПМБ: работа по выделению липолисахаридов туляремийного микроба была проведена совместно с сотрудницей отдела особо опасных инфекций к.б.н. Шайхутдиновой Р.З. Помощь в получении исследуемого материала от зараженных животных оказывали сотрудница лаборатории биологических испытаний к.б.н. Комбарова Т.И. и сотрудницы отдела особо опасных инфекций к.м.н. Титарева Г.М. и Миронова Р.И. Помощь в клонировании и выделении рекомбинантного белка FTT1696 оказали сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов к.м.н. Панферцев Е.А. и сотрудница отдела особо опасных инфекций к.б.н. Кравченко Т.Б. Конструирование ИХ-тестов проводили совместно с сотрудницей отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов к.м.н. Барановой Е.В. Электронно-микроскопические методы исследования выполнялись под руководством д.б.н. Герасимова В.Н. Масс-спектрометрические исследования антигенов *F. tularensis* проведены совместно с сотрудником «Института белка РАН» г. Пущино к.б.н. Суриным А.К. Работа по межлабораторным испытаниям ИХ-тестов была проведена на базе ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора сотрудницей лаборатории туляремии к.б.н. Ароновой Н.В. под руководством заведующей лабораторией туляремии д.м.н. Павлович Н.В.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Комплексная оценка титров специфических антител к трем диагностически значимым антигенам – ЛПС *F. tularensis*, ЛПС *F. novicida* и рекомбинантному белку FTT1696 – повышает специфичность серологических исследований и позволяет отличить инфекционный процесс от вакцинного.

2. Оценка соотношения гидрофильной и гидрофобной части в липополисахариде бактериальных клеток *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida* может служить критерием толщины капсульной составляющей клеточной стенки и быть показателем вирулентности для некоторых подвидов (*tularensis*, *holarctica* и *mediasiatica*).
3. Использование разработанных серологических иммунохроматографических тестов на туляремию повышает эффективность экспресс-диагностики туляремии.

Структура и объем диссертации

Основной текст диссертации изложен на 183 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований с обсуждениями полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 294 работы, из них 74 работы отечественных и 220 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 17 таблицами.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Общие сведения о туляремии

Туляремия – особо опасная инфекция, являющаяся природно-очаговым зоонозом. Этиологический возбудитель этой инфекции – грамотрицательная коккобацилла - *Francisella tularensis* [41,42]. В настоящее время по Международной статистической классификации болезней [35] выделяют следующие клинические формы туляремии: ульцерогландулярная туляремия (по старой классификации – язвенно-бубонная, синоним – кожно-бубонная), окулогландулярная туляремия (глазо-бубонная, офтальмическая); торакальная (легочная туляремия); абдоминальная (желудочно-кишечная туляремия); генерализованная туляремия. Абдоминальная (тифоидная) и торакальная (легочная) форма являются наиболее опасными для людей, с долей летальных случаев у пациентов без надлежащего лечения до 30 % [21,39, 43].

В 1911 г. экспедиция, работавшая под руководством американского микробиолога Мак-Кой (G.W. McCoy) с участием Чарльза Чапина (Ch.W. Chapin), выявила в графстве Туляре (Tulare), Калифорния [42] среди земляных белок и других грызунов эпизоотию чумоподобных заболеваний, при которых возникали бубоны, очень напоминавшие чумные. Исследователи смогли искусственно передавать заболевание от больных животных здоровым, но чумного микроба при этом обнаружить не удалось. Лишь в следующем, 1912 г. удалось выделить возбудителя, названного – *Bacterium tularense* [97]. Во время этой экспедиции некоторые сотрудники заболели, и, тем самым, была доказана опасность возбудителя для человека. Впервые полное описание данного возбудителя дал Эдвард Фрэнсис (Edward Francis) [125], в честь которого возбудитель туляремии получил родовое название – *Francisella* [42].

Род *Francisella* – единственный в семействе *Francisellaceae*, принадлежащему к γ -подклассу протеобактерий. В 1970 г. субкомитет по таксономии пастерелл и сходных микроорганизмов Международного Комитета по систематике бактерий официально утвердил родовое название

Francisella [199]. Ранее к роду *Francisella* относили два вида: *Francisella tularensis* и *Francisella philomiragia*. В настоящее время род включает и другие виды: *F. halioticida*, *F. hispaniensis*, *F. marina*, *F. noatunensis*, *F. persica* [101].

В пределах вида *F. tularensis* выделяют четыре подвида: неарктический (*F. tularensis* subsp. *tularensis*), среднеазиатский (*F. tularensis* subsp. *mediasiatica*), голарктический (*F. tularensis* subsp. *holarctica*) который включает в себя три биологических варианта: биовар I (эритромицин-чувствительный (Ery^S)), биовар II (эритромицин-резистентный (Ery^R)), японский биовар [41]; и подвид *F. tularensis* subsp. *novicida* (*F. novicida*) [158]. В США и странах Западной Европы *F. tularensis* делили на два биовара: тип А и тип В, которые соответствовали подвиду *tularensis* и подвиду *holarctica*, соответственно [41]. Таксономическое положение *F. novicida* на сегодняшний день остается неопределенным. Согласно списку названий бактерий, утвержденному в 1980 г. [248], *F. novicida* является отдельным видом, однако он был причислен к виду *F. tularensis* как подвид *novicida* [161, 272]. В настоящее время исследователи L. C. Kingry и J. M. Petersen [174], основываясь на клинических, экологических, геномных и вирулентных различиях между *F. novicida* и *F. tularensis*, предлагают вновь рассматривать эти микроорганизмы в качестве отдельных видов.

Туляремийный микроб представляет собой мелкие граммотрицательные плеоморфные коккобактерии (от кокковидных до эллипсоидных) размером 0,2-0,7×0,2 мкм (для *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*) и 0,7×1,7 мкм (для *F. tularensis* подвида *novicida* и *F. philomiragia*), окруженные капсулой толщиной 0,06 мкм – 0,12 мкм. Спор не образуют, жгутиков не имеют [30, 41, 109, 117, 178, 187, 270, 288]. На плотных питательных средах возбудитель туляремии формирует круглые мелкоточечные белесоватые колонии с ровными краями. Туляремийный микроб – аэроб, не растет на обычных питательных средах (мясо-пептонный агар и бульон). Обязательными компонентами питательных сред для

культивирования туляремиального микроба являются цистеин, тиамин, глюкоза, а также дефибринированная кровь (до 10 %) или сыворотка (10 %) [41]. Оптимальная температура культивирования 37-38°C, pH среды 6,8-7,3.

До недавнего времени *F. tularensis* subsp. *novicida* представлял собой таксономически самостоятельный вид, включающий лишь один штамм – *F. novicida* Utah 112, выделенный в США из естественного водоема [76, 85, 107, 193, 233]. Однако в 1989 г. появились публикации о выделении от больных людей 16 штаммов бактерий, два из которых, на основании генетических и биохимических признаков, были включены в вид *F. novicida* и обозначены как *F. novicida-like* [174]. Остальные 14 изолированных культур были отнесены к виду *Yersinia philomiragia*, позже – *Francisella philomiragia* [85, 89, 100, 158, 182, 288]. Подробное сравнительное изучение бактерий *F. tularensis*, *F. novicida*, *F. novicida-like* и *F. philomiragia*, проведенное И.С.Мещеряковой с соавтор. [33], выявило существенные различия в их биологических свойствах [33, 117, 126, 288]. Так, было показано, что бактерии *F. tularensis* и *F. novicida* характеризуются значительно более высокой патогенностью для лабораторных животных по сравнению с *F. novicida-like* и *F. philomiragia*. Кроме того, между туляремиальным микробом и штаммом *F. novicida* Utah 112 обнаружена также и наибольшая антигенная общность по белковым и, предположительно, полисахаридным антигенам [33]. При этом у всех представителей рода *Francisella* показано наличие общих перекрестных антигенов белковой природы [50, 51, 52, 230, 236].

Вирулентные бактерии *F. tularensis* при размножении на плотных питательных средах образуют колонии S-формы. Основными компонентами внешней оболочки таких бактерий являются S-форма ЛПС, состоящая из O-полисахарида (O-антигена), присоединенного к липиду А через олигосахарид кора, и капсульный полисахарид [211, 279]. В самых ранних работах по туляремии описан феномен диссоциации культуры вакцинного штамма 15 НИИЭГ на голубые и серые колонии, который отражает существование у

туляремийного микроба капсульных и бескапсульных форм [42, 43]. ЛПС *F. tularensis*, в отличие от ЛПС других патогенных бактерий, не токсичен и не индуцирует провоспалительные цитокины [75].

1.2. Современное состояние эпидемиологической обстановки по заболеваемости туляремией в российской федерации

Практически во всех странах северного полушария в ареале между 30 и 70° с.ш. существуют эндемичные районы этого возбудителя. В Европе туляремия, как болезнь человека, диагностируется с 1917 года в Австрии, с 1926 года в СССР, Норвегии и Германии, а затем практически во всех странах. Наибольшее распространение этой инфекции отмечалось в Чехословакии, Австрии, Германии, Франции, Польше, Швеции [30, 80, 94, 99, 108, 109, 114, 134, 136, 142, 146, 147, 148, 159, 169, 189, 194, 196, 208, 210, 222, 241, 258, 289].

Официальная регистрация туляремии в СССР введена с 1941 года. Туляремия обнаружена во всех регионах России от запада (Кольский полуостров, Карелия, побережье Балтийского моря) до востока (Чукотка, Камчатка, остров Сахалин и Приморский край). К северу очаги туляремии местами распространены до полярного круга и даже частично выходят за него (низовья Печоры, Воркута, Норильск, пойма р. Лены, Чукотка), а самая северная точка обнаружения туляремии – Норильск (69°25" с.ш.). Южная граница природной циркуляции туляремии выходит за пределы Российской Федерации и захватывает Армению, Азербайджан, Туркмению, Южный Казахстан, Алтай, юг Приморского края [30, 31, 39, 40, 42, 43].

Наиболее активные природные очаги туляремии расположены в Центральной части России, в Западной Сибири и приурочены к крупным водным экосистемам. Особую эпидемическую опасность представляют природные очаги пойменно-болотного типа, основными источниками и носителями возбудителя в которых являются околотовные млекопитающие, а переносчиками – кровососущие членистоногие. Природные очаги туляремии представляют собой устойчивые паразитарные системы, характеризующиеся

длительным существованием, многие годы и десятилетия, сохраняющие свой эпизоотический и эпидемический потенциал. Основная часть штаммов, циркулирующих в природных очагах России, принадлежит к голарктическому подвиду, однако в 2011 году на территории Алтайского края Российской Федерации были выделены несколько штаммов, принадлежащих к среднеазиатскому подвиду [36, 271].

Эпизоотическая активизация природных очагов приводила к крупным эпидемическим вспышкам, имевшим место в период, предшествовавший массовой вакцинации населения. Такие вспышки описаны для Центральной европейской части России, Западной Сибири, Поволжья [38].

В последние десятилетия туляремия проявляет себя как спорадическими случаями заболеваемости, так и групповыми заболеваниями и эпидемическими вспышками. Всего с 2001 по 2013 гг. в РФ было зарегистрировано 2817 случаев туляремии. При этом от 60 до 70 % всех случаев приходится на Центральный, Сибирский и Северо-Западный Федеральные округа. Наметились устойчивые тенденции к изменению эпидемического проявления туляремии в большинстве регионов РФ: отмечена резкая урбанизация заболеваемости – на долю городского населения приходится от 70 до 80 % от числа больных туляремией, также до 20-30 % возрастает число заболевших детей в возрасте до 14 лет. Особую опасность представляют трансмиссивные вспышки туляремии, возникающие в природных очагах пойменно-болотного типа.

В 2005 г. был зарегистрирован высокий уровень заболеваемости туляремией – 881 случай в 35 субъектах РФ, а летом 2005 г. произошла трансмиссивная эпидемическая вспышка туляремии, охватившая пять областей Центрального федерального округа: Воронежскую (35 случаев), Рязанскую (135 случаев), Владимирскую (40 случаев), Московскую (403 случая, включая больных, зарегистрированных в г. Москве), Нижегородскую (130 случаев), а также Свердловскую область (33 случая). Всего зарегистрировано 776 больных, из которых 98 – дети до 14 лет. Источником

заражения и факторами передачи возбудителя явились вода и кровососущие двукрылые (в основном слепни). Ведущий тип передачи – трансмиссивный. Преобладали ульцерогландулярная (язвенно-бубонная) и glandулярная (бубонная) клинические формы заболевания при средней и легкой тяжести течения инфекционного процесса [31, 39]. Особенностью современной заболеваемости туляремии является то, что большая часть заболевших, не привитые против этой инфекции, городские жители. Диагноз туляремии был установлен на основании эпидемиологического анализа и клинического проявления инфекции, а также подтвержден лабораторными исследованиями. Поздняя диагностика сказалась на тяжести и длительности заболевания, а также на своевременности проведения противоэпидемических мероприятий.

Подобная ситуация имела место в Архангельской области, где практически ежегодно регистрировались случаи туляремии (125 случаев за 2001-2013 гг.), а в 2010, 2012, 2013 гг. имели место групповые заболевания туляремией. Эпидемиологическая ситуация по туляремии в Архангельской области была неблагоприятной, начиная с 2009 г. Летом 2009 г. были зарегистрированы групповые заболевания туляремией, охватившие по официальным данным, 24 человека; единичные случаи туляремии были осенью 2009 г. и ранней весной 2010 г. Эпидемические проявления туляремийной инфекции привели к трансмиссивной эпидемической вспышке в летний период 2010 г. (40 случаев), охватившей значительную часть местных жителей и отдыхающих. Обращает на себя внимание значительное число заболевших детей – 11 человек в возрасте от 3 до 14 лет. Все больные не вакцинированы против туляремии, а заболевания не были связаны с их профессиональной деятельностью. Анализ клинических проявлений (форм) заболевания, а также время инфицирования – лето 2010 г. (начало заболеваний 26.06.10, последние случаи – начало октября 2010 г.) свидетельствуют о преимущественно трансмиссивном механизме инфицирования (в большинстве случаев обусловленном укусами слепней).

Преобладали заболевания средней степени тяжести (более 90 % случаев), легкие формы (около 9 %) и два случая тяжелого протекания инфекции. Ульцерогландулярная, glandулярная клинические формы туляремии составили около 90 % случаев, ангинозная форма – около 6 % и легочная (бронхиальная) – менее 4 % случаев.

В августе – сентябре 2013 г. в городе Ханты-Мансийске была зарегистрирована трансмиссивная эпидемическая вспышка туляремии, охватившая 1005 человек. Заболевания людей связаны с их пребыванием на территории природного очага туляремии. Высокая эпизоотическая активность природного очага подтверждена выделением культур возбудителя туляремии, обнаружением антител в крови многих видов мелких млекопитающих. Заражение происходило как в черте города, так и за его пределами. Основной клинической формой заболевания была ульцерогландулярная со среднетяжелой или легкой формой течения болезни. Диагностика заболевания базировалась на клинико-эпидемиологических данных и подтверждена лабораторными исследованиями. Использованы как традиционные методы диагностики (реакция агглютинации (РА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)), так и метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для определения ДНК *F. tularensis* [8, 29].

Следует отметить, что эпидемическая вспышка туляремии произошла на фоне существенного уменьшения объема вакцинопрофилактики в городе Ханты-Мансийске, Ханты-Мансийском районе и автономном округе в целом. Это привело к резкому снижению показателей иммунной прослойки населения, проживающего на территории активного очага туляремии, которые варьировали от 0,4 % до 21,4 % в разных административных районах округа, при необходимом уровне защищенности 80-90 %. Значительное снижение объема и качества эпизоотологических исследований и мониторинга территорий активных природных очагов туляремии не позволило своевременно прогнозировать осложнение эпидемической

ситуации и предотвратить развитие эпидемической вспышки. Основным средством остановить распространение эпидемии стала массовая вакцинация населения. За период август-сентябрь 2013 г. в городе было вакцинировано 15 846 человек. Массовая экстренная вакцинация населения, проведенная в условиях чрезвычайной ситуации, сопровождалась предварительным обследованием населения с помощью туляриновой пробы. Всего было поставлено 21 148 проб с тулярином, из которых 3716 (17 %) были положительными. Эта группа людей была исключена из контингента, подлежащего вакцинации. Всего до конца 2013 г. в ХМАО было вакцинировано 28 544 и ревакцинировано 33 759 человек [8, 29].

В связи с заметными изменениями эпидемической активности природных очагов и структуры заболеваемости, особую значимость приобретают контроль эпизоотического состояния природных очагов и прогнозирование их эпидемического проявления с внедрением новых технологий, как в процесс мониторинга природных очагов, так и в совершенствование диагностики туляремии.

1.3. Развитие иммунного ответа при туляремии

Патогенез туляремии обуславливает закономерности иммунологического ответа при данном заболевании, и хотя многие вопросы достаточно хорошо изучены, некоторые из них требуют проведение дальнейших исследований.

Инкубационный период туляремии зависит от количества заражающего материала, варьирует от 1 до 21 дня (в среднем 2 – 6 дней). Каждая клиническая форма туляремии зависит от факторов, связанных с хозяином, микроорганизмом, путем передачи и входными воротами инфекции. Показано, что инфицирование *F. tularensis* вызывает острый воспалительный ответ в месте внедрения возбудителя с участием макрофагов, нейтрофилов и фибрина. Приблизительно спустя 48 – 72 ч после инфицирования активируется ряд цитокинов – гамма-интерферон, фактор некроза опухолей, ИЛ-6 и ИЛ-1 β . Развитие участков некротически

измененных тканей привлекает к ним миграцию Т-лимфоцитов, эпителиоидных и гигантских клеток [156]. При расширении площади некроза возможен тромбоз смежных артерий и вен. Развиваются гранулемы, которые могут подвергаться казеозному некрозу, которые могут сливаться, формируя абсцесс. Эти изменения, возникающие в инфицированном участке, наблюдаются при аутопсии в лимфатических узлах, печени, селезенке, костном мозге и легких [137]. Развивающийся поздний «цитокиновый шторм», вызывает нарушение проницаемости капилляров, повреждение тканей и может привести к развитию тяжелого бактериального сепсиса [238, 285, 290].

Наиболее подробно изучена способность туляремийного микроба размножаться внутри профессиональных фагоцитов [103, 140, 253]. После проникновения в макрофаг *F. tularensis* остается в фагосоме [76, 123], так как бактериальная клетка способна тормозить созревание фагосомы. После захвата бактерии фагосомой, она созревает и переходит в раннюю эндосому, имеющую рН 6,5, затем в позднюю эндосому. Не закисленная фагосома, содержащая *F. tularensis*, не сливается с лизосомой, остается стабильной в течение 2-4 ч, затем мембрана фагосомы разрушается, и микроб выходит в цитоплазму инфицированной клетки, где и начинает размножение [138, 139, 141]. Возбудитель *F. tularensis* сохраняет жизнеспособность в течение длительного периода и оставаясь жизнеспособным в инфицированных тканях.

Первые симптомы заболевания обусловлены реакцией врожденного иммунитета на внедрение туляремийного микроба. В течение второй или третьей недели инфекции развивается гуморальный иммунный ответ против поверхностных антигенов бактерий, в том числе липополисахарида. В это время определяются агглютинирующие антитела – иммуноглобулины М (IgM), IgG, и IgA [293]. Также продуцируются опсонизирующие IgG и IgM - антитела, которые действуют совместно с комплементом (С3).

Принято считать, что ведущую роль в защитном ответе при туляремии играет клеточное звено иммунитета [115, 263, 264]. Для многих внутриклеточных патогенов клеточный ответ рассматривается, как наиболее эффективный, поскольку внутриклеточная бактерия, ограниченная клеткой хозяина, не доступна для действия антител, поэтому титр антител зачастую не коррелирует с уровнем протективной защиты. Механизмы Т-клеточной защиты, такие, как синтез цитокинов и прямая цитотоксичность, вероятно, наиболее эффективны при внутриклеточных инфекциях [107]. Прямым доказательством формирования специфических клеточных реакций служит характерная пролиферация CD4⁺ и CD8⁺ Т клеток, продуцирующих ИЛ-2 и гамма-интерферон при рестимуляции специфическим антигеном [120, 121, 122, 171, 172, 242, 243]. По данным исследователей, клеточный иммунный ответ сохраняется длительное время (до 25 лет) [121]. Показано, что вакцинация штаммом LVS является эффективной при заражении вирулентными штаммами голарктического и неарктического подвидов [98, 102, 105, 111, 143, 171, 195, 244]. Однако, удаление CD4⁺ и CD8⁺ Т клеток или снижение уровня гамма-интерферона перед заражением штаммом типа А приводит к отсутствию защиты у мышей [104, 127]. С другой стороны, перенос неиммунным животным моноядерных лейкоцитов от мышей, инфицированных *F. tularensis*, обеспечивал реципиентам устойчивость к последующему заражению вирулентными штаммами туляремиального микроба [263]. В противоположность этому, введение животным иммунной туляремиальной сыворотки не предотвращало их гибель от вирулентных штаммов *F. tularensis*. Некоторым противоречием этому выглядят результаты исследования S. Stenmark et al. (2000) [254], когда введение дефектным по В-клеткам мышам противотуляремиальной иммунной сыворотки обеспечивало их защиту от подкожного заражения летальными дозами вакцинного и вирулентного штаммов [254].

Таким образом, диагностика противотуляреминого иммунитета может складываться из оценки специфического клеточного и гуморального иммунитета

1.4. Иммунодиагностика туляремии

Сохранение эпизоотически активных природных очагов, вероятность применения *Francisella tularensis* при биотеррористических актах [26, 27, 28, 30, 109], определенные сложности при постановке клинического диагноза требуют совершенствование лабораторной диагностики этой инфекции.

Диагностика туляремии складывается из индикации и идентификации возбудителя или его специфических антигенов и определения сывороточных антител у человека и восприимчивых животных [112, 166, 176, 177]. Следует отметить, что индикация и идентификация возбудителя, его специфических антигенов необходима, прежде всего, для контроля активности природных очагов, с этой целью используют бактериологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы исследования [78, 116, 166].

Из иммунодиагностических методов в отечественной практике наиболее распространены реакция агглютинации [219, 232] и реакция непрямой гемагглютинации, недостатками которых являются возможность перекрестного реагирования с возбудителем бруцеллеза и невысокая чувствительность [34, 42, 64]. В области разработки новых способов детекции туляреминого микроба ведутся активные исследования [2, 6, 46, 53, 64, 167, 180, 252]. Для мониторинга эпизоотий туляремии, для установления клинического диагноза, для проведения дифференциального диагноза большое значение имеет определение сывороточных противотуляреминых антител у животных в природных очагах туляремии и заболевших людей.

К настоящему времени для диагностики туляремии отечественными и зарубежными учеными предложено множество эффективных иммунодиагностических тестов. Однако большая их часть –

экспериментальные разработки. В нашей стране выпускаются лишь препараты старого поколения, тогда как новые тест-системы, отвечающие современным требованиям чувствительности и экспрессности, отсутствуют.

Обнаружение специфических сывороточных антител с целью установления диагноза у больного или переболевшего (ретроспективная диагностика), оценки иммунологического статуса привитых, а также определение сывороточных противотуляреминых антител у животных в природных очагах туляремии – одно из важных направлений в иммунодиагностике туляремии [252, 293]. Серологические методы занимают главенствующее место при диагностике туляремии в связи с особенностями течения инфекции у человека, характеризующейся малым обсеменением органов и тканей возбудителем и трудностями его выделения. В настоящее время разработаны, апробированы и находят применение различные варианты иммунодиагностики туляремии: реакция иммунофлюоресценции (РИФ), реакция пассивной гемагглютинации и нейтрализации антител (РИГА, РНАт), иммуноферментный анализ (ИФА) [26, 64, 213, 256, 257, 259], иммунорадиометрический метод (ИРМА), реакция коагглютинации и другие.

Наиболее важным компонентом таких иммунодиагностических тестов является их антигенная составляющая. Известно, что ЛПС и белки ВМ для возбудителя туляремии влияют на специфичность иммунного ответа макроорганизма, обладают уникальной полиэпитопной антигенной структурой и рассматриваются как перспективные антигены для создания диагностических препаратов [2, 4, 50, 68, 69, 71, 81, 105, 115, 207, 294].

Наиболее часто для обнаружения специфических сывороточных антител применяется РА, которую обычно ставят объемным способом по общепринятой методике с использованием диагностикума туляреминого жидкого для объемной и кровяно-капельной реакции агглютинации производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Омск и Ставрополь («Диагностикум туляреминый жидкий для объемной и кровянокапельной реакции агглютинации»). Ранее применялась РИГА с

коммерческим туляреминым антигенным эритроцитарным диагностикумом (Одесса), выпуск которого прекращен в 1996 г. [73].

Несмотря на достаточную специфичность, описанные реакции обладают всеми недостатками иммуносуппензионных тестов. Значительно большей информативностью обладают различные модификации ELISA и иммуноблоттинг, применяемые для определения специфических антител у животных и человека. К примеру, микроточечный иммуноферментный анализ на нитроцеллюлозной мембране с визуальной индикацией результатов был с успехом использован для определения IgG в поствакцинальный период у обезьян гамадрилов [74]. В сравнительных экспериментах чувствительность данного метода не отличалась от чувствительности ИФА со спектрофотометрической детекцией результатов и превышала чувствительность РПГА в 10–20 раз, а реакции микроагглютинации – в 10 – 1000 раз. Дот-иммуноанализ на основе S-ЛПС *F. tularensis* оказался эффективным в определении гомологичных антител у больных и иммунизированных людей, и животных [2, 4]. Для выявления специфических антител в сыворотках крови людей, вакцинированных против туляремии, методом DELFIA в качестве конъюгата применяли меченный европием белок А. Данный вариант иммуноанализа оказался в 10–40 раз более чувствительным, чем ИФА с пероксидазными конъюгатами, даже при условии использования авидин-биотиновой системы [9].

Немецкими учеными показана информативность ELISA на основе ЛПС и коммерческих наборов для иммуноблоттинга, предназначенных для детекции туляреминых антител, при исследовании сывороток кабанов. Оригинальный подход для детекции анти-ЛПС антител в формате microarray разработали ученые из США. Ими был использован ЛПС *F. tularensis*, иммобилизованный на покрытых нитроцеллюлозой стеклянных пластинках, что позволяло сохранить доступность эпитопов для связывания с антителами. Порог чувствительности данного метода составил 10 нг/мл антител, что в 100 раз выше чувствительности традиционных иммунофлуоресцентных

анализов. При исследовании собачьих сывороток в положительных образцах регистрировался значительно более высокий уровень антител к ЛПС, чем в отрицательных [268]. Не менее эффективным при конструировании microarray-тест-систем оказалось использование для сенсбилизации покрытых нитроцеллюлозой стеклянных субстратов цельных бактериальных клеток [267].

Процесс совершенствования иммунологической диагностики туляремии идет по пути повышения чувствительности и специфичности уже существующих методов, а также разработки новых высокоэффективных тестов, позволяющих сократить сроки анализа при сохранении высокой достоверности результатов [12, 113, 116, 213, 251, 252]. Одним из приемов для достижения этой цели явилось применение очищенного ЛПС *F. tularensis* в качестве антигенного препарата, что позволило повысить чувствительность и специфичность ряда методов [113, 213, 234, 286]. Качественно новым этапом в разработке высокоэффективных методов и тест-систем для иммунодиагностики туляремии явилось использование различных модификаций иммуноферментного анализа, отличающегося высокой чувствительностью, специфичностью, относительной быстротой анализа и автоматическим учетом результатов [26, 234, 239]. Дот-иммуноанализ или дот-блот представляет собой одну из более простых и дешевых модификаций ИФА, которую часто используют для диагностики различных инфекций [22]. Усилия разработчиков направлены на повышение порога чувствительности тест-систем, полное исключение неспецифических реакций, упрощение процедуры постановки и учета реакции и доведение экспериментальных разработок до выпуска сертифицированного препарата.

1.5. Поверхностные структуры и иммунодоминантные антигены

F. tularensis

Известно, что антигенными свойствами могут обладать многие компоненты бактериальной клетки - жгутики, капсула, клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, составляющие цитоплазмы, а также токсины

и ферменты, секретируемые микробом во внешнюю среду [19]. На первом этапе инфекционного процесса ключевым моментом активации защитных сил хозяина является контакт иммунокомпетентных клеток макроорганизма с поверхностными структурами возбудителя, содержащими наибольшее количество высокоспецифических антигенных детерминант.

Поверхностные структуры играют значительную роль в реализации патогенных и иммуногенных свойств бактерий рода *Francisella*, в том числе и *F. tularensis*. Они характеризуются наличием одинаковой по строению клеточной оболочки, состоящей из клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. В структуру клеточной стенки входит наружная мембрана, пептидогликановый слой и периплазматическая зона. У вакцинных штаммов *F. tularensis* пептидогликановый слой выражен слабо, его толщина варьирует от 2 до 6 нм, у вирулентных штаммов клеточная стенка имеет широкий компактный слой пептидогликана толщиной от 6 до 14 нм. Пептидогликан связан поперечными липопротеидными мостиками с наружной мембраной и у вирулентных штаммов полностью заполняет периплазматическую зону [24, 25]. Заметных различий в субмикроскопической структуре изученных штаммов голарктического и неарктического подвидов *F. tularensis* не обнаружено. Недавно, при изучении ультраструктуры вакцинного штамма, на поверхности клеток были выявлены нитеподобные структуры, схожие с пилями IV типа А, у высоковирулентного штамма Schu S4 были идентифицированы гены, ответственные за их синтез [144]. Как клеточная стенка, так и наружная мембрана туляремиального микроба обладают выраженным протективным действием в опытах на лабораторных животных [13, 20, 47, 68, 115, 128, 129, 214]. Установлено, что препараты наружной мембраны более эффективно защищали белых мышей от заражения, чем убитые целые клетки [20, 129, 240, 275]. Протективные свойства наружной мембраны убедительно прослеживаются в работах с иммунизацией обезьян [13] и морских свинок [68].

Клеточная стенка многих грам-отрицательных бактерий содержит несколько разновидностей низкомолекулярных липопротеинов (мол.масса < 7 кДа), ковалентно связанных с пептидогликаном [83, 191]. Они являются нетоксичными и не пирогенными адъювантами, проявляющими свою активность, как при парентеральной, так и пероральной иммунизации [116, 212]. В поверхностных структурах клеток *F. tularensis* обнаружен иммунохимически специфичный липопротеин с молекулярной массой 17 кДа (TUL4), обладающий стимулирующим действием на сенсibilизированные Т-клетки [243, 246, 247, 266]. По-видимому, липопротеин TUL4 *F. tularensis* участвует в формировании протективного иммунитета при туляремии [245]. Кроме того, показано, что белки туляремийного микроба с молекулярными массами 17-19 кДа эффективно выявляются в иммуноблотинге сыворотками инфицированных или иммунизированных людей и животных.

Для факультативных внутриклеточных паразитов, способных пребывать какое-то время во внешней среде, общим признаком является наличие системы температурной регуляции синтеза факторов патогенности. Система белков теплового шока экспериментально показана и у туляремийного микроба. Отмечена связь между повышением вирулентности вакцинного штамма и появлением в его клеточной стенке ряда белков теплового шока, из которых наиболее значительными были полипептиды с молекулярными массами 16, 60 и 75 kDa.

Наружная мембрана туляремийного микроба состоит из белков, липополисахаридов и фосфолипидов. Содержание ЛПС в наружной мембране может колебаться в пределах от 14 до 44 %. Он представляет собой характерный компонент наружных мембран грам-отрицательных бактерий. [191]. У *F. tularensis*, как и у некоторых других грам-отрицательных бактерий [24, 25] ЛПС обнаруживается и в капсульном веществе [77, 224]. ЛПС *F. tularensis* вирулентных штаммов относится к S-типу [279, 280] и состоит из гидрофобного липидного компонента - липида А, [145] и гидрофильной полисахаридной части, которая подразделяется на O-специфическую цепь

(О-полисахарид) и олигосахаридный остов (так называемый кор-олигосахарид, или просто кор).

В коровом олигосахариде ЛПС различают две области: внутреннюю и внешнюю. Внешняя область, связанная с О-замещенной цепью, состоит из гексозного олигосахариды. Внутренняя область представляет собой пентасахарид, состоящий из остатков 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО). У большинства грам-отрицательных бактерий в качестве пентозы находится гептоза [145].

Процесс диссоциации клеток туляреминого микроба из S- в R-форму, в первую очередь, сопряжен с изменением синтеза углеводсодержащих компонентов клеточной стенки и возбудитель полностью лишается как вирулентных, так и протективных свойств [27, 44, 45, 48]. Получены изогенные авирулентные R-мутанты *F. tularensis* с различными нарушениями синтеза и сборки ЛПС [58, 79, 228]. Формирование авирулентного фенотипа происходит либо по пути синтеза капсулодефицитными бактериями R-форм ЛПС, лишенных полисахаридных цепей [58, 79, 228], либо по пути SR-форм ЛПС, имеющих только одну О-специфическую боковую цепь [58]. Вакцинный штамм, сохраняя остаточную вирулентность, наряду с S-формой ЛПС производит и R-форму ЛПС [150, 249]. Ранее было показано, что типичные вирулентные штаммы синтезируют одновременно два типа S-ЛПС с различной антигенной специфичностью. Первый тип S-ЛПС содержит детерминанты, высокоспецифичные для *F. tularensis*, тогда как на второй форме S-ЛПС локализованы антигенные детерминанты общие с S-ЛПС *F. novicida* [25, 70]. Биологическая целесообразность этого явления до настоящего времени мало понятна. Возможно, что наличие у туляреминого микроба двух форм липополисахарида является материальной основой для фазовых вариаций в ответ на неблагоприятные внешние воздействия. Подтверждением способности туляреминого микроба модифицировать ЛПС могут служить данные S.C. Cowley с соавт. о присутствии у мутантов вакцинного штамма

F. tularensis необычного S-ЛПС с антигенными эпитопами, специфичными для *F. novicida* [107]. Более того, после цикла внутриклеточного размножения в макрофагах крыс такие мутанты способны восстанавливать антигенную специфичность, присущую родительскому штамму *F. tularensis* [107]. Обращает на себя внимание тот факт, что изменение антигенной специфичности сопровождается и изменением биологической функции ЛПС. В частности, ЛПС туляремийного микроба ингибирует продукцию NO радикалов в макрофагах, в то время как ЛПС *F. novicida* не обладает этим свойством. Последнее способствует быстрой гибели бактерий в макрофагах хозяина. Таким образом, была показана принципиальная возможность фазовых вариаций ЛПС туляремийного микроба, сопровождающихся появлением в структуре ЛПС антигенных эпитопов слабопатогенного близкородственного микроорганизма [1, 3]. Следует отметить, что один из капсульных гликолипидов, также обладает сродством с *F. novicida* [63].

Основную роль в индукции специфического гуморального иммунитета при туляремии, по-видимому, играют антигенные эпитопы O-полисахаридной цепи ЛПС [4, 106, 107, 117, 183, 206]. Установлено, что все штаммы *F. tularensis* обладают иммунохимически подобным O-специфическим антигеном, и как следствие, у *F. tularensis* нет серовариантов [145, 215]. Среди антител, реагирующих с ЛПС туляремийного микроба, преобладают иммуноглобулины класса G, главным образом, изотипа IgG2a [127].

Одним из факторов существования серологических перекрестных реакций *F. tularensis* с другими грам-отрицательными бактериями является наличие у молекул ЛПС схожих антигенных эпитопов. O-полисахаридная часть ЛПС туляремийного микроба, состоящая из повторяющихся тетрасахаридных блоков, представляющих собой цепь последовательно соединенных углеводов (α -D-GalNAcAN- α -D-GalNAcAN β -D-QuiNAc и β -DQui4NFm) [145]. Отмечено структурное сходство с O-антигеном *F. novicida*, который так же представляет собой повторяющийся тетрасахарид, но имеет

некоторые отличия: вместо β -DQui4NFm имеется еще один остаток α -D-GalNAcAN, а вместо β -D-QuiNAc - остаток β -DQui2NAc4NAc [145].

Именно О-антиген является основным индуктором продукции высокоспецифических антител, в то время как иммуноглобулины против коровых антигенных эпитопов характеризуются перекрестной специфичностью [44, 70, 131, 273]. Отмечены перекрестные реакции с бруцеллами, холерными вибрионами, возбудителем псевдотуберкулеза, сапа и мелиоидоза [82, 175]. Однако, с использованием техники моноклональных антител было показано, что антитела к О-блоку ЛПС не дают перекрестных реакций с представителями других видов и родов бактерий, в то время как моноклональные антитела к коровым эпитопам взаимодействовали с ЛПС холерного вибриона [131]. В этой работе был выявлен также интересный факт: моноклональные антитела и к О-полисахариду, и к коре ЛПС давали положительную реакцию с туляремиальным микробом в ИФА, но только иммуноглобулины против О-блоков ЛПС вступали в реакцию в иммуноблоттинге. По-видимому, чувствительность метода позволяет выявлять лишь наиболее представленные в количественном отношении высокоспецифичные эпитопы О-полисахаридной области ЛПС.

ЛПС туляремиального микроба, имея принципиальное сходство с обобщенной моделью ЛПС энтеробактерий, отличается от других бактериальных эндотоксинов [206, 224]. ЛПС *F. tularensis* обладает, по меньшей мере, одной активностью: способностью активировать систему комплемента по классическому пути [132]. Он не обладает летальной токсичностью, как для белых мышей [281], так и для кроликов [203], не является пирогеном и проявляет в 1000 раз меньшую активность в тесте гелирования лизатов амебоцитов *Limulus polyphemus*, чем стандартные эндотоксины [163], усиливает токсическое действие сублетальных доз классического эндотоксина [70].

Общепризнано, что свойственная бактериальным ЛПС биологическая активность связана с липидом А [154, 200, 217, 216, 218,

286]. Структурный анализ ЛПС туляремиального микроба выявил необычную структуру его липидной части [192, 216]. В его составе отмечен существенно ограниченный набор жирных кислот [79, 145, 149, 168]. Следует отметить, что препараты ЛПС, выделенные даже из высоковирулентных штаммов *F.tularensis*, биологически инертны и не обладают свойствами классического эндотоксина [130, 204, 224, 227]. Например, очищенные препараты ЛПС не индуцируют образования ИЛ-1 моноцитами и очень слабо влияют на продукцию ФНО- α и кислородных радикалов макрофагами [117]. На модели изогенных авирулентных капсулодефектных мутантов, полученных из природных штаммов и синтезирующих дефектные формы ЛПС, продемонстрировано, что только полноценный ЛПС способен обеспечивать микробной клетке такие преимущества, как резистентность к бактерицидному действию нормальной (не иммунной) сыворотки и устойчивость к фагоцитозу [48, 250].

Показано, что иммунизация препаратами ЛПС защищает животных только от заражения штаммами туляремиального микроба со сниженной вирулентностью. При заражении высоковирулентными штаммами увеличивается лишь продолжительность жизни павших животных [128]. О-полисахарид ЛПС *F. tularensis*, конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином, полностью защищал белых мышей от внутрикожного и, частично, от аэрозольного заражения вирулентным голарктическим штаммом, но не от аэрозольного заражения высоковирулентным штаммом туляремиального микроба [181, 242, 291]. Роль ЛПС в индукции протективного иммунитета подтверждается и работами по изучению превентивных свойств мышинной сыворотки и МКА, специфичных к ЛПС *F. tularensis* [10].

Таким образом, не обладая выраженной токсичностью и протективной активностью, характерных для эндотоксинов многих грамм-отрицательных бактерий, ЛПС туляремиального микроба, тем не менее, играет существенную роль в патогенезе и иммуногенезе туляремии и, обладая

антигенными свойствами, является на данный момент основным диагностическим антигеном [59, 107, 168, 223].

Как отмечено выше, еще одним компонентом наружной мембраны бактериальных клеток *F. tularensis* является белок, содержание которого составляет от 12 до 20 % [52]. Электрофоретический анализ белков наружной мембраны свидетельствует о значительном сходстве качественного состава и распределения белковых фракций у различных по вирулентности штаммов туляремиального микроба. В состав клеток вакцинного и вирулентных штаммов, относящихся к различным подвидам *F. tularensis*, а также их мутантов, входят белки с широким диапазоном мол. масс (от 100 кДа до 15 кДа и ниже) [52, 160, 209, 278]. Сравнительный анализ состава основных белков наружной мембраны позволил идентифицировать 4 мажорных полипептида с мол. массами 68, 59, 48 и 37 кДа и около 10 минорных полипептидов. Голарктические штаммы содержат большее число белков, чем неарктические штаммы [58, 247, 226]. По данным В.М. Сорокина с соавт. мажорными белками наружной мембраны являются полипептиды с мол.массами 65, 60, 50, 40, 20 и 17 кДа [58.]. Наиболее характерными антигенами наружной мембраны у *F. tularensis*, по мнению других исследователей, являются белки с мол. массами 63-65, 48, 41-43, 32-35 кДа и несколько компонентов с мол. массами от 15 кДа и меньше [51]. У бескапсульного вакцинного штамма основными белками являются мембранные полипептиды с молекулярной массой 61, 37, 32, 17,5 кДа [231].

Проведение иммуноблотинга белков наружной мембраны различных штаммов свидетельствует о наличии значительного количества идентичных по электрофоретической подвижности и сходных по серологической активности антигенных зон в диапазоне молекулярных масс от более 14 кДа и менее 116 кДа. Эти антигены представляют собой либо индивидуальные белки, либо агрегаты нескольких субъединиц. Сопоставление полученных данных показало, что мембранные белковые антигены у анализируемых

штаммов располагаются в диапазоне молекулярных масс от 14 до 70 кДа [56].

Один из мажорных белков, модифицируемый при нагревании и имеющий мол. массу около 34 кДа, получил название ForA (от *Francisella* outer membrane protein) [128, 162]. При солюбилизации мембран при температуре ниже 80° С белок мигрирует в ДСН-ПАГЭ в виде полипептида молекулярной массой 34 кДа, однако при температуре солюбилизации 95 °С мигрировал в виде удвоенного полипептида с молекулярной массой 41 и 43 кДа. Рекомбинантный белок ForA, экспрессирующийся в *E. coli*, сохранял свои свойства и локализацию в наружной мембране. Возможно, что ForA идентичен иммунодоминантному белку с молекулярной массой 43 кДа, который, по всей видимости, является порином [84] и может быть использован для лабораторной диагностики туляремии. Этот белок относят к родоспецифическим антигенам франциселл [209]. Поверхностный белок с молекулярной массой 63 кДа обладает способностью связываться с IgG человека и кролика [69].

Как правило, все поверхностные белки грамм-отрицательных бактерий иммуногенны при иммунизации лабораторных животных. В процессе естественного или экспериментального инфекционного процесса также происходит образование антител против многих из этих белков. Судя по результатам перекрестного иммуноэлектрофореза и иммуноблотинга, такие антитела реагируют с солюбилизированными и денатурированными под действием детергентов формами белков [110, 133]. Белки наружной мембраны туляремийного микроба наряду с ЛПС обуславливают специфичность иммунного ответа макроорганизма [153].

В спектре белков наружной мембраны *F. tularensis*, при всей схожести у разных подвидов, все же отмечаются и качественные различия, связанные, по крайней мере, с одним полипептидом с молекулярной массой 92 кДа [173, 201, 202]. Получены МКА, проявляющие сродство к антигенам вакцинных, вирулентных и авирулентных штаммов голарктического подвида

туляремийного микроба, но не к антигенам штаммов неарктического и среднеазиатского подвидов. Область специфического взаимодействия этих МКА связана с полипептидами с мол. массой 33 и 38 кДа [122].

Полученные с помощью различных методов экстракты наружной мембраны туляремийного микроба оказывают выраженный иммуномодулирующий эффект на различные формы функциональной активности макрофагов и Т-лимфоцитов [57, 292]. Антигенная фракция с мол. массой 85-200 кДа ингибирует, а фракция с мол. массой 15-35 кДа оказывает стимулирующее действие на процессы адгезии и поглощения корпускулярного антигена, презентацию антигена на поверхности макрофагов и т. д. [57].

Основные мембранные полипептиды бескапсульного вакцинного штамма индуцируют пролиферацию лимфоцитов вакцинированных и перенесших туляремию людей [246]. Отмечена продукция гамма-интерферона Т-клетками ($CD4^+$, $CD8^+$) у сенсibilизированных индивидуумов в ответ на белки наружных мембран *F. tularensis* [113]. Однако количество белков, связанных с клеточным иммунитетом, не ограничивается описанными полипептидами. Так, семь фракций наружных мембран вакцинного штамма *F. tularensis*, разделенных препаративным ДСН-электрофорезом в полиакриламидном геле и содержащих различное количество полипептидов, вызывали пролиферацию сенсibilизированных лимфоцитов и синтез интерферона [246].

Сравнительно недавно у возбудителя туляремии были обнаружены 4 стрессовых белка, продукция которых связана с выживанием бактерий внутри макрофагов [117]. Один из них, 23кДа белок, исследованный более подробно, имеет важное значение при инфекционном процессе [141]. Функция этого белка связана с ингибированием ЛПС-опосредованной продукцией цитокинов [265]. В этом контексте интересен факт, выявленный английскими исследователями, о связи протективного иммунитета при туляремии с продукцией цитокинов и, в частности, ИЛ-12 [151, 195].

Установлено, что при неэффективной иммунизации мышей убитыми клетками туляремиального микроба или стрессовым белком GroL, параллельное введение ИЛ-12 обеспечивает высокую защиту животных [151].

В недавних исследованиях, касающихся серодиагностики туляремии с применением современного микрочипового протеомного анализа, была рассмотрена полезность использования отдельных белковых антигенов – это FTT0077 (SucB), FTT0106, FTT1696 (GroEL), FTT0472 (AccB) и FTT0975 [54, 164, 165, 201]. Из них особенно интересен белок FTT1696 (GroEL), член семейства белков теплового шока, который показал высокую специфичность по отношению к другим бактериям. Он показал высокую чувствительность и специфичность – 100% и 94% – соответственно, при исследованиях сыворотки на туляремию доноров и переболевших с помощью иммунострипа. Другим представляющим интерес антигеном является FTT0975, гипотетический белок неизвестной функции.

1.6. Заключение по обзору литературы

Проведенный анализ литературных данных свидетельствует, что сохранение природных очагов, эпидемиологическая значимость туляремии требуют совершенствование диагностики этого заболевания, как среди людей, так и среди животных. Надзор за активностью природных очагов, основанный на серодиагностических исследованиях, позволяет проводить своевременную вакцинацию в группах риска среди населения, дезинсекционные мероприятия, направленные на снижение количества инфицированных переносчиков и контролировать численность грызунов, являющихся основным резервуаром для сохранения возбудителя. Все эти мероприятия должны проводиться в соответствии с нормативными документами [37]. Очевидно, что совершенствование иммунодиагностики туляремии должно идти по пути повышения чувствительности и специфичности уже существующих методов, а также разработки новых

высокоэффективных тестов, позволяющих сократить сроки анализа при сохранении высокой достоверности результатов [28, 66, 117].

К настоящему времени поверхностные структуры бактериальных клеток *F. tularensis* (капсула, клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, составляющие цитоплазмы) достаточно хорошо изучены. Тем не менее, подвидовые особенности антигенов туляремийного микроба их диагностическая значимость представляют, как теоретический, так и практический интерес. Поверхностные антигенные структуры туляремийной микробной клетки, воспринимаемые организмом как чужеродная информация, являются основными мишенями действия иммунной системы макроорганизма и обеспечивают развитие специфического иммунитета. Для туляремии эффективность защиты обеспечивается клеточным и гуморальным звеньями иммунитета. Конечно, такое деление является чисто схематичным, однако это позволяет специфическую активацию иммунокомпетентных клеток относить к клеточному, а продукцию специфических антител – к гуморальному иммунитету [107, 113, 176, 282].

Диагностика туляремии традиционно основана на выявлении специфических антител к антигенам туляремийного микроба. Однако современные представления о сохранении иммунитета к туляремии после перенесенного заболевания в течении 25 лет и может быть более длительного срока, требуют совершенствование диагностических методов. В туляремийном микробе методом протеомного микроэррея обнаружен 1741 белок [122], обладающих разной степенью иммунологической активности, что требует выявления наиболее диагностически значимых антигенов, повышающих точность и быстроту постановки диагноза.

Несмотря на большое количество работ по изучению ЛПС туляремийного микроба [77, 145, 224, 279, 280], вопросы, касающиеся степени участия этого полисахарида в образовании капсулы, до конца не выяснены. При одинаковой химической структуре О-антигена у штаммов подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* мы не нашли объяснения

феномена, обнаруженного Павлович Н.В. [1, 3], положительных серологических реакций сывороток людей, переболевших туляремией, с ЛПС *F. novicida*.

Кроме того, существующие на отечественном рынке тест системы для серологических исследований на туляремию порой имеют не удовлетворительное качество из-за не высокой степени стандартизации и низкой чувствительности. Выявление и характеристика иммунодиагностически значимых белковых антигенов и изучение возможности использования их в серодиагностических исследованиях с целью дополнительных признаков инфицирования возбудителем туляремии, безусловно, имеет перспективное значение. Появившийся недавно на рынке формат иммунохроматографического анализа (ИХА), не требующий оборудования, высокой квалификации персонала, позволяющий получать результаты за 10-15 минут, интересен для экспрессных серологических тестов на туляремию [60].

Таким образом, актуальность наших исследований не вызывает сомнений. Получение новых данных об ЛПС туляремийного микроба, традиционно используемом в качестве серодиагностического антигена, а также выбор белков, которые могут стать дополнительными антигенами для установления диагноза туляремии, безусловно, являются актуальными исследованиями этого опасного инфекционного заболевания. Анализ туляремийных антигенов необходим для разработки современных ИХ-тестов для ускоренной диагностики и возможности их использования в полевых условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Липополисахарид туляремийного микроба – уникальный антигенный компонент клеточной стенки

Структура туляремийного ЛПС достаточно хорошо изучена и имеет классическое для грам-отрицательных бактерий строение. У природных штаммов *F. tularensis* ЛПС состоит из О-полисахарида (О-антигена), присоединенного к липиду А через олигосахарид кора (S форма ЛПС) [279, 280]. Однако некоторые особенности туляремийного ЛПС, такие как биологическая инертность очищенных препаратов, выделенных даже из вирулентных штаммов возбудителя, преобладание свободного липида А, наличие в нем только четырех длинных (3-НОС18, 3-НОС18-0-С16, 3-НОС18) жирнокислотных остатков, наличие в коре только одного Kdo, привлекают пристальное внимание исследователей [204, 284]. Кроме того, в последние годы исследователи уделяют большое внимание капсуле, которая, по мнению некоторых, представляет собой полисахарид, идентичный О-антигену [77, 224]. Поскольку основную роль в гуморальном иммунитете при туляремии играют антитела против липополисахарида (ЛПС) [107, 127, 132], изучение его антигенных свойств является актуальным.

2.1. Сравнительный анализ липополисахаридов клеточной стенки бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*)

Задача этой части исследований заключалась в поиске молекулярных основ различий в иммунологических реакциях с ЛПС *F. novicida* у вакцинированных и переболевших людей.

Выделение ЛПС из штаммов бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*) проводили микрометодом по Westphal [286]. На рисунке 1 представлена электрофореграмма препаратов ЛПС *F. tularensis* различных подвидов

(*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*), выделенных микрометодом с последующей обработкой протеиназой К с использованием разных методов окраски.

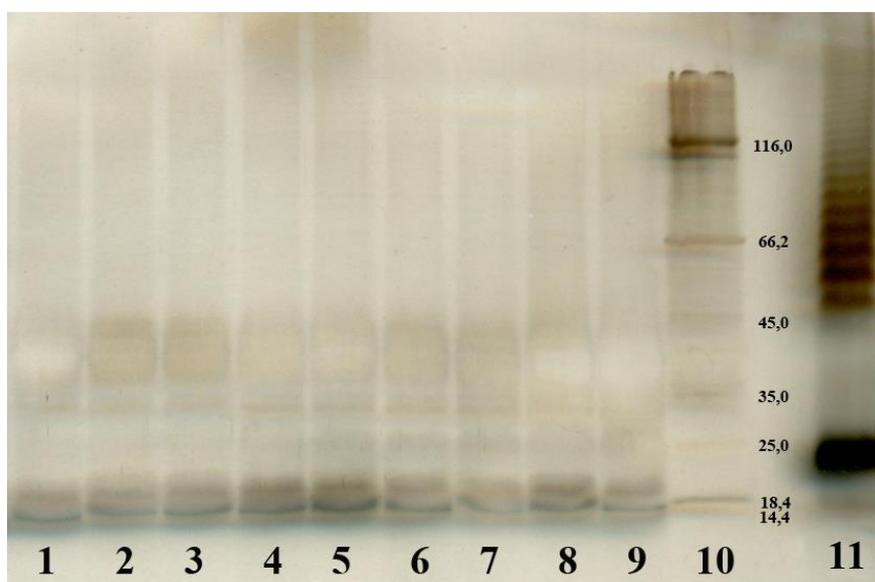


Рисунок 1 – Электрофоретическое разделение препаратов ЛПС *F. tularensis* различных подвидов, выделенных микрометодом, обработанных протеиназой К; окрашивание ионами серебра.

Примечание* *ssp holarctica* 1- 15НИИЭГ, 2- 503, 3- А1045; *ssp tularensis* 4- Schu, 5- А'Cole В-399; *ssp mediasiatica* 6- 554, 7-120, 8-678; *novicida* 9-Utah112; 10- маркер молекулярных весов (Ferments#0431), 11- ЛПС *E. coli*

Наши исследования показали, что одной из особенностей туляремийного ЛПС является его плохая выявляемость на электрофореграммах при использовании метода окраски ионами серебра.

Окрашивание геля с использованием ионов серебра показывает, что все препараты ЛПС, выделенные из штаммов туляремийного микроба различных подвидов (Рисунок 1, треки 1-3 штаммы подвида *holarctica*; треки 4-5 штаммы подвида *tularensis*; треки 6-8 штаммы подвида *mediasiatica*; трек 9 штамм подвида *novicida*) имеют очень схожие картинки электрофореграмм. На рисунке 1 показано, что на фоне ряда окрашенных полос мы не наблюдали типичной «лесенки» О-антигена, связанной с присутствием в составе препаратов ЛПС структур с различной длиной олисахаридных цепей, обуславливающих различный молекулярный вес, что свойственно, в частности, типичному ЛПС, полученному из *E. coli* (Рисунок 1, трек 11). Это, вероятно, связано с уникальными свойствами сахаров, входящих в его состав,

которые не подвергаются окислению при данном способе окрашивания. Препарат классического ЛПС грамотрицательной бактерии *E. coli* (Рисунок 1, трек 11) имеет типичную картину, свойственную грамотрицательным бактериям.

2.2. Определение иммунологически активных структур в молекуле ЛПС *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*) в реакции иммуноблотинга и дот-блота

Для определения иммунологически активных центров связывания молекулы ЛПС со специфическими антителами нам необходимо было получить сыворотки животных, зараженных штаммами различных подвидов *F. tularensis* - *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*.

Учитывая высокую чувствительность к туляремии лабораторных мышей и морских свинок, мы использовали крыс линии Wistar, поскольку только от этих малочувствительных к туляремии животных мы могли получить сыворотку после заражения вирулентными штаммами различных подвидов без предварительной иммунизации. На 21 сутки после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ (subsp. *holarctica*) и заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*), *F. tularensis* A-678 (subsp. *mediasiatica*), *F. tularensis* Schu (subsp. *tularensis*) и *F. tularensis* Utah112 (subsp. *novicida*) у животных проводили забор крови для получения сыворотки. Полученные сыворотки использовали для проведения иммуноблотинга и дот-блота с препаратами ЛПС *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*), выделенных по методу Westphal. Данные представлены на рисунке 2. Иммуноблоты проводили с сыворотками, полученными от крыс, зараженных вирулентными штаммами всех перечисленных выше подвидов, с сывороткой крыс, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и с сывороткой крыс, инфицированных штаммом *F. tularensis* Utah112 (subsp. *novicida*).

Сыворотка, полученная от животного, инфицированного штаммом подвида *novicida*, связывалась только с ЛПС данного подвида, сыворотка от

вакцинированного животного связывалась с ЛПС *F. tularensis* всех подвидов, кроме подвида *novicida* (данные не показаны). Сыворотки, полученные от крыс, зараженных вирулентными штаммами всех подвидов, реагировали с различными ЛПС примерно одинаково (Рисунок 2). На рисунке 2 представлен иммуноблот препаратов ЛПС, выделенных из бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов, с сывороткой крысы линии Wistar, зараженной вирулентным штаммом *F. tularensis* 678 (subsp. *mediasiatica*), в качестве контроля использовали ЛПС *E. coli* (Рисунок 2, трек 3).

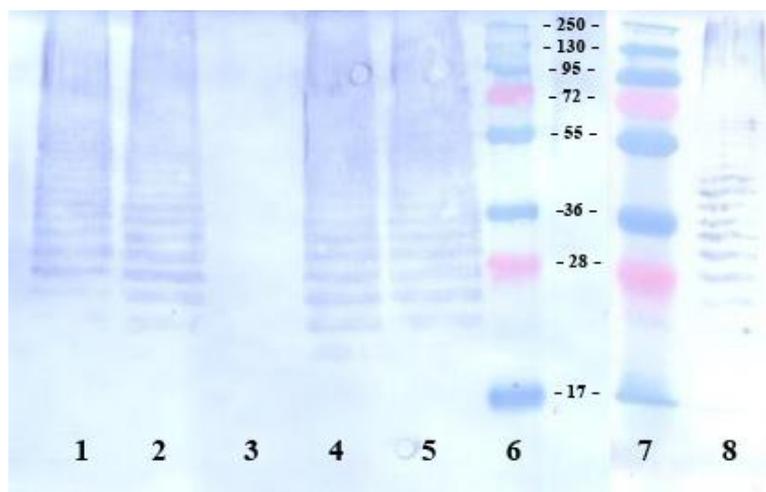


Рисунок 2 – Иммуноблот препаратов ЛПС, выделенных из бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов, с сывороткой крысы линии Wistar, зараженной вирулентным штаммом *F. tularensis* 678 (ssp. *mediasiatica*)

Примечание* 1 – *F. tularensis* 15НИИЭГ; 2 – *F. tularensis* 503; 3 – *E. coli*; 4 – *F. tularensis* Schu; 5 – *F. tularensis* 678; 6, 7 – маркеры молекулярной массы (Thermo#26619); 8 – *F. novicida* Utah112

Сыворотки иммунизированных и инфицированных крыс были исследованы методом дот-блот анализа с ЛПС вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (subsp. *holarctica*) и ЛПС штамма *F. tularensis* Utah112 (subsp. *novicida*)

Результаты исследования сывороток методом дот-блот анализа представлены на рисунке 3.

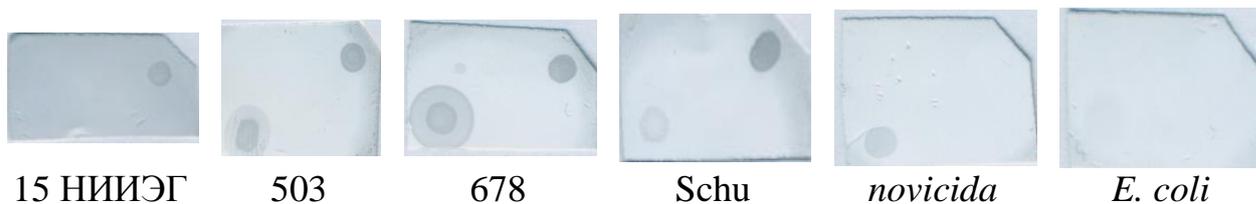


Рисунок 3 – Результаты дот-блота с сыворотками крыс после вакцинации (10^8 м.к./крысу) штаммом 15 НИИЭГ или заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* различных подвидов (10^5 м.к./крысу). В качестве отрицательного контроля использована сыворотка крысы, зараженной (10^8 м.к./крысу) *E. coli*
 Примечание* В правом нижнем углу нанесен препарат ЛПС *F. novicida* Utah112, в левом верхнем – препарат ЛПС *F. tularensis* 15НИИЭГ

Дот-блот подтверждают результаты иммуноблотов и результаты Павлович Н. В. [1, 3] о наличие специфических антител к ЛПС *F. tularensis*, и к ЛПС *F. novicida* при заражение вирулентными штаммами, в то время как при вакцинном процессе антитела к ЛПС *F. novicida* отсутствуют.

2.3. Сравнительный анализ гидрофобной и гидрофильной составляющих липополисахарида клеточной стенки бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*)

Как отмечено выше, в последние годы исследователи пристальное внимание уделяют капсуле туляремийного микроба [77, 79, 224]. В самых ранних работах по туляремии описан феномен диссоциации культуры вакцинного штамма 15 НИИЭГ на голубые и серые колонии, который отражает существование у туляремийного микроба капсульных и бескапсульных форм [42, 43]. До настоящего времени структура капсулы полностью не изучена и поэтому по-прежнему привлекает внимание исследователей [249, 250]. Известно, что наличие капсулы и её толщина влияют на вирулентность штаммов. Гены, ответственные за формирование капсулы, обнаружены у всех подвидов *F. tularensis*, в том числе и *F. novicida* [174, 224].

Как отмечено выше, липид А является гидрофобной, а кор и О-антиген – гидрофильной частью молекулы липополисахарида. Показано, что капсула, представляющая собой полисахарид, идентичный О-антигену, является отдельным элементом, не связанным с молекулой ЛПС, входящей в

структуру клеточной стенки, но при этом достаточно прочно ковалентно связана с бактериальной клеткой [77]. С другой стороны, около 60% молекул липида А *F. tularensis* являются свободными, не связанными с гидрофильной частью молекулы ЛПС [77]. Учитывая, что О-антиген является наиболее иммунореактивной частью липополисахаридной молекулы, мы оценили соотношение гидрофобной и гидрофильной составляющих ЛПС у различных подвидов *F. tularensis*.

С этой целью препаративные количества ЛПС, выделенные из штаммов различных подвидов, были подвергнуты мягкому кислотному гидролизу. После этого была определена масса липида А (гидрофобной) и углеводной (гидрофильной) части в каждом полученном образце. Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты мягкого кислотного гидролиза липополисахарида клеточной стенки бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов

Штаммы <i>F. tularensis</i> , (метод выделения по Westphal)	Подвид	Масса проб для кислотного гидролиза, мг	Масса углеводной части ЛПС, мг	Масса липида А, мг	Время появления осадка, мин	Отношение углеводной части/ к липиду А
15 НИИЭГ	<i>holarctica</i>	70	0,0385	0,0333	30	1,2
503	<i>holarctica</i>	70	0,0504	0,0190	40	2,7
A-678	<i>mediasiatica</i>	70	0,0432	0,0258	60	1,7
Schu	<i>tularensis</i>	70	0,0506	0,0169	105	3,0
Utah112	<i>novicida</i>	25	0,0159	0,0090	105	1,8

Полученные результаты позволили нам определить отношение массы липида А к массе углеводной части ЛПС для исследуемых штаммов различных подвидов и различной степени вирулентности. Интересно отметить, что для самого вирулентного из выбранных штамма Schu подвида *tularensis* соотношение массы липида А к массе углеводной части было равно 3, т.е. на одну гидрофильную часть, основой которой является О-антиген, приходится в 3 раза меньше массы липида А. Для штамма 503 голарктического подвида это соотношение составляет 2,7, для штамма 678 среднеазиатского подвида и для штамма Utah112 *F. novicida* соотношение

гидрофобной и гидрофильной части составляет соответственно 1,7 и 1,8, наименьшим (1,2) это соотношение оказалось у вакцинного штамма 15 НИИЭГ (Таблица 6).

Учитывая, что О-антиген представляет собой повторяющийся тетрасахарид известной химической структуры, можно предположить, что в вирулентных штаммах 503, 678 и Schu и в штамме Utah112 (subsp. *novicida*) количество повторов структурной единицы О-антигена выше, чем в вакцинном штамме 15 НИИЭГ. Возможно, такое превалирование гидрофильной части может обуславливать и наибольшую толщину капсульного вещества при условии приблизительно равных размеров бактериальной клетки у разных подвидов, а для вакцинного штамма 15 НИИЭГ характерно малое количество повторов структурной единицы О-антигена, и как следствие, уменьшение толщины капсулы.

Особый интерес представляет результат мягкого кислотного гидролиза штамма Utah112 *F. novicida* – для него соотношение гидрофобной и гидрофильной части составляет – 1,8, что ставит его в один ряд с природными штаммами 678 среднеазиатского подвида. Мы не нашли в литературе данных о наличии и у *F. novicida* капсулы, хотя, как упоминалось ранее, гены, ответственные за синтез капсулы, аналогичные генам штамма Schu и LVS, у него присутствуют [224].

2.4. Изучение методом электронной микроскопии бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*) на наличие капсулы

Если химическая структура липополисахарида *F. tularensis* у разных подвидов хорошо изучена [145, 279, 280], то современных данных о различиях в параметрах капсулы для разных подвидов практически отсутствуют. Только в работе Apicella, M.A (2010) [77] приводятся данные иммуноэлектронной микроскопии по демонстрации капсулы у штаммов Schu и LVS с помощью меченных золотом моноклональных антител 11B7 к капсуле.

Для анализа внешних морфологических структур микробных клеток *F. tularensis* разных подвидов мы использовали электронную микроскопию – метод негативного контрастирования. Этот метод позволяет проводить морфологический и морфометрический скрининг микробной популяции, что было использовано нами для исследования рабочей коллекции штаммов на наличие капсулы и для определения её толщины.

Подготовка образцов для электронной микроскопии проводилась по стандартной методике, для чего петля бактериальной массы из единичных колоний двухсуточной культуры была фиксирована в 4% глутаровом альдегиде и передавалась в специализированную лабораторию нашего Центра (Рисунок 4).

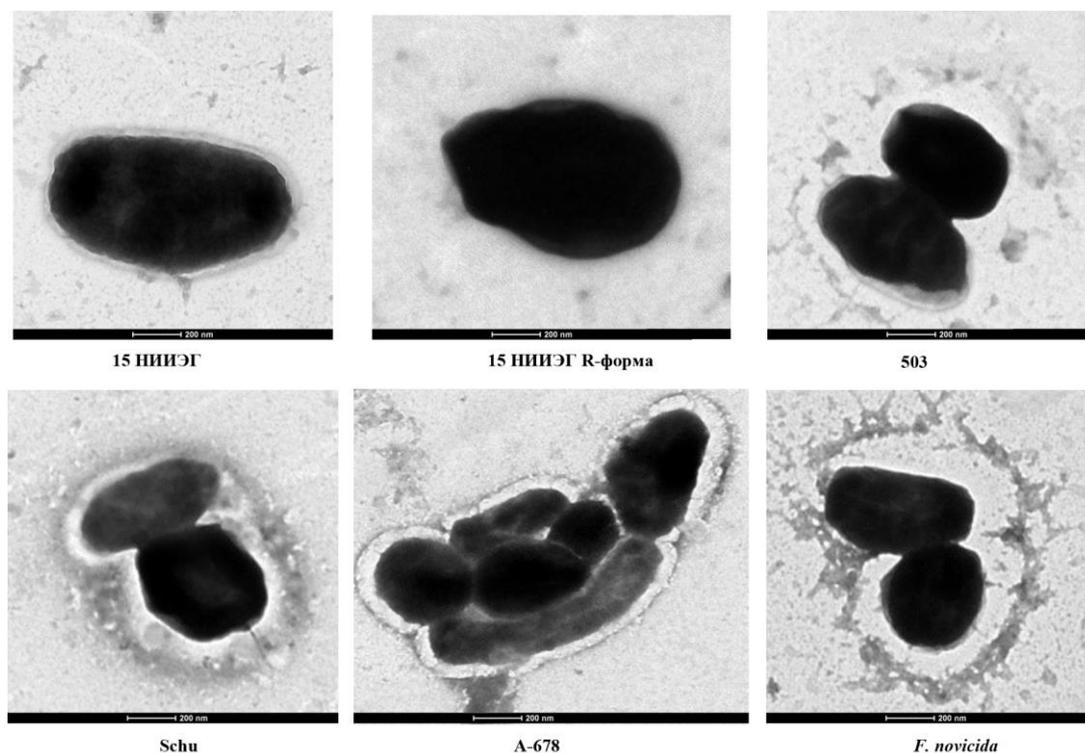


Рисунок 4 – Электронно-микроскопическое изображение негативно-контрастированных бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов

Анализ электронно-микроскопических изображений бактериальных клеток штаммов разных подвидов показал, что клетки всех изучаемых штаммов, кроме R-формы вакцинного штамма, окружены капсульным веществом. Капсульное вещество у штамма 15 НИИЭГ при

контрастировании изображения видно очень слабо, среди всех изученных штаммов её толщина наименьшая и составляет $50\div 100$ нм. У вирулентных штаммов 503 subsp. *holarctica*, A-678 subsp. *mediasiatica* и наиболее вирулентного штамма Schu subsp. *tularensis* толщина капсулы составила $150\div 250$ нм. Следует отметить, на подготовленных для электронной микроскопии препаратах бактериальных клеток штамма Schu наблюдали большой процент клеток, у которых капсула отсутствовала, что позволило нам предположить, что для данного штамма характерно быстрое слущивание капсулы, наличие капсулы на вирулентных штаммах более выражено на молодых делящихся клетках. Интересно, что для клеток штамма Utah112 *F. novicida* толщина капсулы не отличалась от толщины капсулы вирулентных штаммов и составляла также, по нашим данным, $150\div 250$ нм (Рисунок 4). Наши результаты по анализу толщины капсулы, определенной методом электронной микроскопии и анализу соотношений гидрофобной и гидрофильной части выделенных ЛПС штаммов различных подвидов позволили обнаружить нам некую корреляцию между этими двумя показателями (для штамма 15 НИИЭГ это соотношение составляет 1,2 а для остальных штаммов, включая *F. novicida* – от 1,7 до 3,0 (Таблица 6) и сделать предположение, что толщина капсулы у туляремийного микроба может быть связана с увеличением отношения углеводной составляющей ЛПС к липиду А.

2.5. Заключение по Главе 2

В исследованиях, касающихся изучения липополисахарида туляремийного микроба, являющегося основным антигенным компонентом его клеточной стенки, мы опирались на данные зарубежных исследователей о его структуре [145, 224, 279, 280]. Особенностью туляремийного ЛПС является биологическая инертность очищенных препаратов, преобладание свободного липида А, наличие в нем только четырех длинных жирнокислотных остатков, наличие в коре только одного Kdo [204, 284]. Кроме того, в последние годы исследователи большое внимание уделяют

капсуле, которая, по мнению некоторых, представляет собой полисахарид, идентичный О-антигену [77, 224].

Как указывалось ранее по данным Gunn J.S., (2007) [145], химическая структура О-антигена липополисахарида голарктического, среднеазиатского и неарктического подвидов представляет собой повторяющийся тетрасахарид, состоящий из последовательно соединенных углеводов (α -D-GalNAcAN- α -D-GalNAcAN), которые соединены с β -D-QuiNAc и β -DQui4NFm. Структура *F. novicida* так же представляет собой повторяющийся тетрасахарид, но имеет некоторые отличия в составе сахаров: вместо β -DQui4NFm имеется еще один остаток α -D-GalNAcAN, а вместо β -D-QuiNAc - остаток β -DQui2NAc4NAc [145].

Предполагая, что О-антиген является основной составляющей капсульного вещества, а именно его толщиной определяется вирулентность штаммов [77, 224], мы выделили ЛПС из штаммов бактериальных клеток *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*) методом Westphal и провели сравнительный анализ полученных препаратов. Электрофорез образцов подтвердил, что традиционное окрашивание ЛПС серебром не позволяет выявлять спектр структур О-антигена с различным молекулярным весом. Сравнение электрофореграмм и иммуноблотов ЛПС *F. tularensis* различных подвидов показало, что все образцы имеют достаточно схожие картинки (Рисунок 1, 2). Тем не менее, когда препаративные количества ЛПС, выделенные из штаммов различных подвидов, были подвергнуты мягкому кислотному гидролизу, было обнаружено, что соотношение массовой доли липида А (гидрофобной) к массовой доли углеводной (гидрофильной) части различны для исследованных штаммов (Таблица 6). Это позволило нам предположить, что эти различия обусловлены толщиной капсульного вещества для каждого штамма. Для подтверждения нашего предположения все изучаемые штаммы исследовали методом электронной микроскопии (Рисунок 4). Размер капсульного вещества, определенный методом электронной микроскопии,

для каждого штамма коррелировал с соотношением гидрофильной и гидрофобной части в препаратах ЛПС, полученных из этих же штаммов. У вирулентных штаммов *F. tularensis* толщина капсулы и соотношение гидрофильной и гидрофобной частями было выше, чем у вакцинного штамма 15НИИЭГ. Наши результаты исследований по штамму Utah112 *F. novicida* свидетельствуют, что этот штамм обладает капсулой, которая выявляется методом электронной микроскопии, и соотношение гидрофильной и гидрофобной частями приближено к значениям, характерным для вирулентных штаммов (Рисунок 4, Таблица 6). Эти данные расходятся с данными Apicella M.A (2010) [77], который в своей работе показывает, что у *F. novicida* нет структур, связывающихся с моноклональными антителами 11B7 и FB11, которые специфичны для капсулы и О-антигена *F. tularensis*. Однако мы считаем, что это является только косвенным доказательством отсутствия капсульного вещества, поскольку возможно, что эти антитела имеют узкую специфичность и, как следствие, не распознают сходные эпитопы в капсульном веществе *F. novicida*. Показано, что МКАТ распознают комплексные эпитопы, состоящие из 6 сахаров. К примеру, в публикации Roche M.I. (2011) [223] рассматриваются специфические взаимодействия МКАТ FB11 и Ab52 с О-антигеном; МКАТ FB11 специфично к терминальному участку (или сахарам), а МКАТ Ab52 связывается с внутренними эпитопами О-антигена. В работе Rynkiewicz M.J. (2012) [225] путем кристаллографического анализа был смоделирован комплекс, образующийся при взаимодействии О-антигена *F. tularensis* и антитела Ab52, в котором участвуют шесть сахаров О-антигена α -D-Gal p NAcAN - α -D-Gal pNAcAN - β -D-Qui p NAc - β -D-Qui p 4NFm - α -D-Gal p NAcAN - α -D-Gal pNAcAN. Использование авторами Apicella M.A (2010) [77] всего двух моноклональных антител 11B7 и FB11, специфичных для капсульного вещества и О-антигена *F. tularensis*, которые не взаимодействовали с эпитопами О-антигена *F. novicida*, не дает достаточных оснований считать, что у этого подвида нет соответствующих

структур. При условии получения широкого спектра МКАТ разной специфичности к О-антигену вирулентных штаммов, имеющих выраженную капсулу, можно было бы получить либо доказательство наличия перекрестных реакций с присутствующим в *F. novicida* капсульным веществом, либо опровержение нашего предположения. К сожалению, получение мышинных моноклональных антител к вирулентным штаммам *F. tularensis* является практически не решаемой задачей в виду высокой чувствительности мышей к этому патогену. Остальные виды животных не используются для получения моноклональных антител.

Полученные нами результаты электронной микроскопии и анализ продуктов мягкого кислотного гидролиза исследуемых штаммов позволили нам выдвинуть предположение, что толщина капсулы у туляремиального микроба может быть связана с соотношением углеводной (гидрофильной) составляющей к липиду А (гидрофобной) ЛПС. Возможно, увеличение числа повторяющихся звеньев, составляющих структурную единицу О-антигена, обуславливает толщину капсулы и, как следствие, обеспечивает появление большего разнообразия эпитопов для связывания антител, которые могут реагировать и с ЛПС *F. novicida*. Именно меньшая (по сравнению с вирулентными штаммами) толщина капсулы вакцинного штамма 15НИИЭГ может служить причиной того, что после вакцинации в сыворотке вакцинированных АТ, которые могут связываться с ЛПС *F. novicida*, не выявляются.

ГЛАВА 3. Белок GroEL FTT1696 – иммунодиагностически значимый антиген туляремийного микроба

Обнаружение 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 [96, 118, 119, 122, 152, 153, 229]. К настоящему времени выделен ряд белков, перспективных для иммунодиагностики туляремии: дигидролипоамид сукцинилтрансфераза (FTT077), пируватдегидрогеназа E2 (FTT1484), белок-шаперон GroEL (FTT1696), ацетил-СоА карбоксилаза (FTT0472), гипотетический белок (FTT1441) and 50S рибосомальный белок L7/L12 (FTT0143) [229]. Было показано, что наиболее иммунореактивным из них, особенно при иммунизации живыми и убитыми бактериальными клетками штамма LVS *F. tularensis*, является белок-шаперон GroEL FTT1696 [13, 229].

3.1. Выявление наиболее иммунореактивных антигенов белковой природы *F. tularensis*

Препарат ультразвукового дезинтеграта (УЗД) *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ был изучен методом электрофореза. Для выявления серологически активных антигенных компонентов, распознаваемых антителами сывороток как вакцинированных, так и больных туляремией людей и животных, препарат УЗД был исследован методом иммуноблотинга. Иммуноблотинг проводили с пулированной сывороткой вакцинированных и зараженных возбудителем туляремии кроликов. Результаты исследований представлены на рисунке 5.

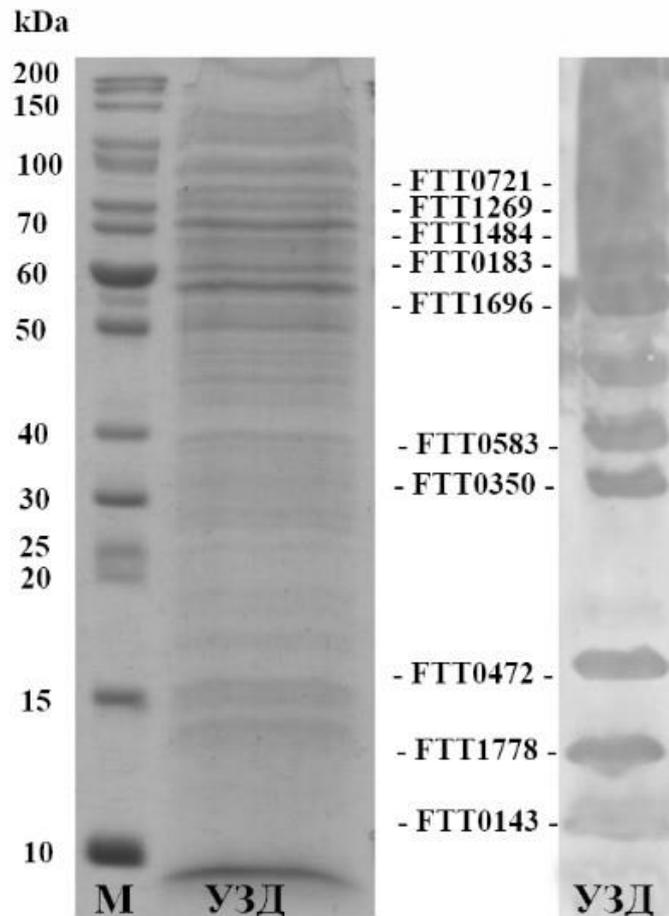


Рисунок 5 – Электрофореграмма (А) УЗД *F. tularensis* 15НИИЭГ и иммуноблот (Б) с пулированной сывороткой кроликов, вакцинированных штаммом 15НИИЭГ и зараженных вирулентным штаммом 503 *F. tularensis*.

Примечание* М - маркер молекулярных весов Bio-Rad#1610378; УЗД – ультразвуковой дезинтегратор (УЗД) *F. tularensis*15НИИЭГ

Результат визуального анализа полученных электрофореграммы и иммуноблота позволил нам выявить достаточно большой репертуар антител, реагирующих с различными белками УЗД *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В литературе при описании протеомного микроэрей анализа идентифицирован 1741 белок, выявляемый в сыворотке мышей иммунизированных штаммом LVS, среди которых наиболее реактивными были 48 антигенов [122]. Другие данные свидетельствуют, что различные линии мышей (BALB/c и C57/BL) в ответ на вакцинацию LVS дают различия в профиле иммунореактивных белков [153]. Несколько отличающиеся профили иммунореактивных белков показаны и при исследованиях сывороток вакцинированных и переболевших людей [153].

Задачей нашего исследования был поиск и изучение антигенов, перспективных для использования в серодиагностике туляремии. По сопоставлению данных иммуноблотов и электрофореза были определены и выделены те белковые фракции, которые давали четкие положительные результаты во всех исследованиях. В результате проведенного анализа были выделены 19 белковых полос, которые были вырезаны из ПАА геля и переданы на масс-спектрометрический анализ.

После проведения гидролиза подготовленных проб двумя протеазами – трипсином и протеазой К, полученные пептиды анализировали методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения на масс-спектрометре OrbiTrap Elite (Thermo Scientific, Германия). Ионизацию проводили методом электрораспыления (EP). Фрагментацию ионов проводили методом диссоциации активированной соударением (ДАС). Полученные массы пептидов и спектры фрагментации анализировали с помощью программы PeaksStudio 7,5. В результате анализа были идентифицированы 10 белковых фракций, которые обладали выраженной серологической активностью. Результат масс-спектрометрического анализа представлен в таблице 7.

Таблица 7 – Основные иммунодоминантные белки *F. tularensis*, идентифицированные масс-спектрометрическим анализом

№ полосы (рисунок 1*)	Молекулярный вес кД	Предполагаемый антиген (по данным)
1	12,8	50S рибосомальный белок L7/L12 (FTT0143)
2	13,7	Гипотетический мембранный белок (FTT1778)
3	16,4	Ацетил-СоА карбоксилаза (FTT0472)
4	35,3	Альфа субъединица ДНК-зависимой РНК-полимеразы (FTT0350)
5	41,4	Ассоциированный с внешней мембраной белок ForA (FTT0583)
6	57,3	Белок-шаперон GroEL (FTT1696).

Продолжение таблицы 7

№ полосы (рисунок 1*)	Молекулярный вес кД	Предполагаемый антиген (по данным)
7	61,5	30S рибосомальный белок S1 FTT0183
8	67,3	Компонент пируват дегидрогеназа E2 (FTT1484)
9	69,2	Белок-шаперон DnaK (FTT1269)
10	82,5	Фермент пероксидаза/каталаза (FTT0721)

По данным ряда исследователей, белок FTT1696 [122, 152, 153, 162, 164, 255, 276, 277, 278] обладает наиболее выраженным иммунореактивным действием. Поэтому именно этот белок был выбран нами для клонирования его в клетках *E. coli* с целью получения рекомбинантного белка FTT1696 для изучения возможности его применения в иммунодиагностических целях.

3.2. Клонирование, выделение и очистка рекомбинантного белка FTT1696

Для получения рекомбинантного белка FTT1696 была использована экспрессионная система *E. coli*. Ген этого белка FTT1696 (1635 п. о.) амплифицировали с хромосомы штамма 15 НИИЭГ *F. tularensis*. Очищенный ПЦР продукт использовали в качестве матрицы для амплификации гена GroEL со специфическими праймерами. Ген белка вставили в плазмиду pET32b(+) между сайтами рестрикции NdeI в позиции 639 и либо XhoI в позиции 158. Ген белка FTT1696 клонировали в открытую рамку считывания с нуклеотидной последовательностью шести аминокислотных остатков гистидина в позициях 152-157. Экспрессию белка проводили в штамме BL21-pET32(b+)/FTT1696 *E. coli* под индукцией 1мМ ИПТГ и селективным давлением ампицилина 50мкг\мл. Оптимальный уровень экспрессии белка был достигнут через 4 ч индукции.

Рекомбинантный белок экспрессировался как в цитоплазме, так и в тельцах включения. Выделение белка FTT1696 как цитоплазматической

(растворимой) формы, так и из телец включения проводили металл-хелатирующей хроматографией с использованием колонки с хелатирующей сефарозой (объем сорбента 5 мл) (GE Healthcare, Швеция) с иммобилизованными ионами Ni^{2+} и уравновешенной буфером для связывания. После нанесения образца, промывки стартовым буфером (буфер для связывания) и промывки промежуточными буферами с концентрациями имидазола 20 и 60 мМ проводили элюцию раствором, содержащим 1 М имидазола для цитоплазматической (растворимой) формы и 0,5 М имидазола для телец включения (Рисунок 6).

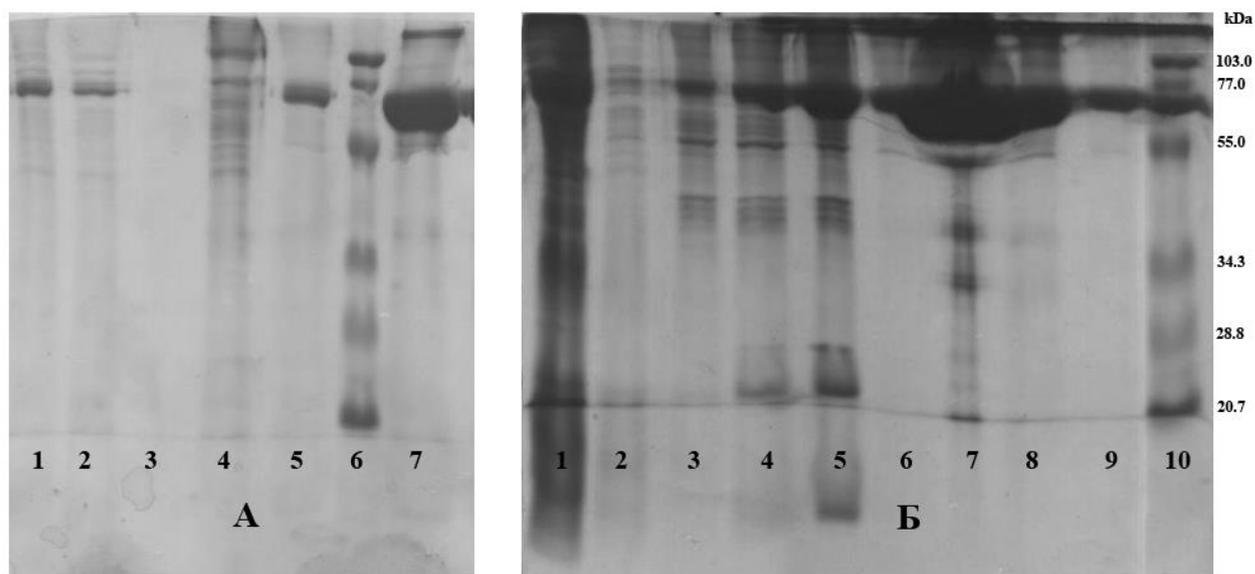


Рисунок 6 – Электрофореграмма фракций, полученных при выделении рекомбинантного белка FTT1696 из цитоплазмы (А) и телец включения (Б).

Примечание* **А:** 1-исходный препарат (супернатант); 2-фракция, не связавшаяся с сорбентом; 3- фракция промывки стартовым буфером; 4- фракция промывки буфером с 20 мМ имидазола; 5- промывка буфером с 60 мМ имидазола; 6 - маркеры молекулярной массы Bio-Rad #1610305; 7- фракция, элюированная 1М имидазолом;

Б: 1-фракция солюбилизованных телец, не связавшаяся с сорбентом; 2-фракция промывки стартовым буфером; 3, 4 - фракции промывки буфером с 20 мМ имидазола; 5, 6 фракции промывки буфером с 60 мМ имидазола; 7-9 фракции, элюированные раствором с 0,5 М имидазола; 10 - маркеры молекулярной массы Bio-Rad #1610305

Согласно полученным электрофоретическим данным (Рисунок 6А), рекомбинантный белок из цитоплазмы начинал элюироваться с сорбента при концентрации имидазола 60 мМ, однако основной белок элюировался при концентрации имидазола 1 М (Рисунок 6А), из телец включения белок

начинал элюироваться с сорбента при концентрации имидазола 20 мМ, однако основной белок элюировался при концентрации имидазола 0,5 М (Рисунок 6Б).

Молекулярную массу белка определяли по ДСН - электрофорезу в 10 - 12% ПААГ в сравнении с маркерами молекулярной массы белков (Рисунок 6А, Б). Молекулярная масса рекомбинантного белка FTT1696 соответствовала расчетным данным, исходя из аминокислотного состава и составляла 58 кД.

Экспрессию рекомбинантного белка FTT1696 детектировали при помощи вестерн-блот анализа с использованием моноклональных антител к полигистидиновому домену гибридного белка (Рисунок 7).

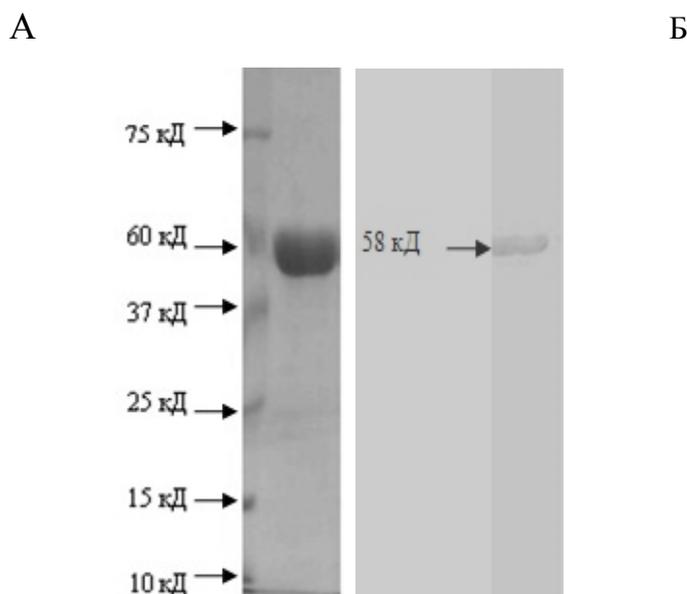


Рисунок 7 – Электрофореграмма (А) и иммуноблот (Б) с гипериммунной кроличьей сывороткой рекомбинантного белка FTT1696:

Примечание* маркеры молекулярной массы Bio-Rad #1610375; очищенный рекомбинантный белок FTT1696-(His)₆

Электрофоретический анализ белка FTT1696 показал, что он практически свободен от примесей других белков: чистота препарата по белку составила 95-98 %, молекулярная масса – 58 кДа (Рисунок 7). Масс-спектрометрический анализ выделенного белка показал, что полученный рекомбинантный белок по аминокислотному составу и молекулярному весу гомологичен белку GroEL FTT1696 из штамма 15 НИИЭГ *F. tularensis*

голарктического подвида. Препарат очищенного белка был использован для получения гипериммунной сыворотки кролика.

3.3. Анализ наличия белка FTT1696 в препаратах УЗД термолизатов штаммов *F. tularensis* различных подвидов

Согласно данным литературы, некоторые бактериальные белки являются либо уникальными для конкретных подвидов туляремиального микроба, либо у разных подвидов может иметь место различный уровень их экспрессии [160, 229]. Нами был изучен белковый профиль препаратов УЗД, полученных из термолизатов отдельных штаммов представительного набора штаммов *F. tularensis* различных подвидов, в аспекте обнаружения присутствия в них белка FTT1696. Электрофореграмма и иммуноблот с гипериммунной кроличьей сывороткой к рекомбинантному белку FTT1696 приведены на рисунке 8.

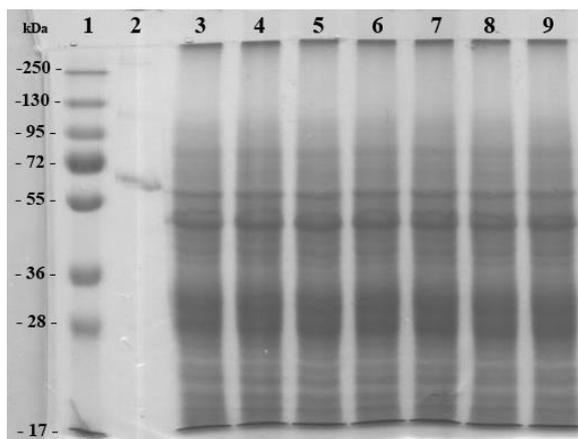


Рисунок 8 – Электрофореграмма термолизатов бактериальных клеток штаммов *F. tularensis*.

Примечание*1 - маркеры молекулярной массы (Thermo#26619); 2 – очищенный белок FTT1696; 3 - *F. tularensis* Schu (ssp. *tularensis*); 4 - *F. tularensis* A-Cole (ssp. *tularensis*); 5 - *F. tularensis* 503 (ssp. *holartica*); 6 - *F. tularensis* 1045 (ssp. *holartica*); 7 - *F. tularensis* 15НИИЭГ (ssp. *holartica*); 8 - *F. tularensis* 120 (ssp. *mediasiatica*); 9 - *F. tularensis* 678 (ssp. *mediasiatica*)

Иммуноблоттинг препаратов УЗД термолизатов штаммов *F. tularensis* всех подвидов с использованием гипериммунной кроличьей сыворотки к рекомбинантному белку FTT1696 приведен на рисунке 9. В качестве контроля неспецифического взаимодействия полученной сыворотки с

гетерогенными антигенами были дополнительно использованы образцы термолизатов неродственных бактерий *L. pneumophila*, *B. abortus* и *E. coli*.

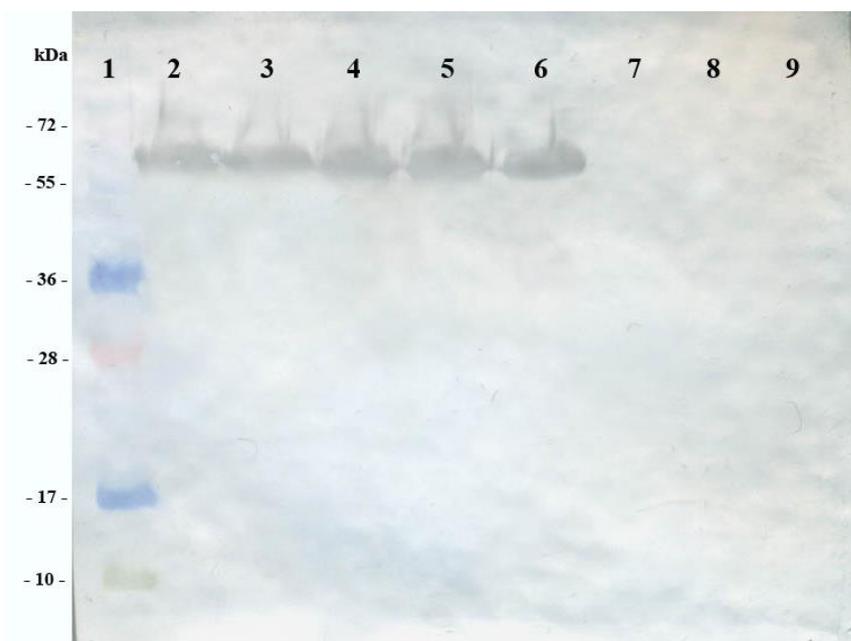


Рисунок 9 – Иммуноблот с гипериммунной кроличьей сывороткой к рекомбинантному белку FTT1696 с термолизатов бактериальных клеток штаммов *F. tularensis*.

Примечание*1 – маркер молекулярной массы (Thermo#26619); 2 – белок FTT1696; 3 – *F. tularensis* Schu; 4 – *F. tularensis* 503; 5 – *F. tularensis* 678; 6 – *F. tularensis* 15НИИЭГ; 7 – *L. pneumophila*; 8 – *B. abortus*; 9 – *E. coli*.

Приведенные данные свидетельствуют, что в препаратах УЗД всех исследуемых штаммов туляремиального микроба наблюдается белковая полоса в области, соответствующей белку FTT1696 (~58 кДа) примерно одинаковой интенсивности, что позволяет сделать вывод о наличии этого белка в штаммах *F. tularensis* всех трех подвигов – *spp. tularensis*, *holartica*, *mediasiatrica*, экспрессируемого примерно в равной степени. Отсутствие соответствующей полосы в препаратах не родственных штаммов свидетельствует об отсутствии неспецифического взаимодействия сыворотки с гетерологичными антигенами и специфическом распознавании антителами сыворотки соответствующих эпитопов в молекуле клонированного белка FTT1696. Это, безусловно, является важным фактом, поскольку исследователями неоднократно сообщалось о наличии перекрестных реакций с антигенами *L. pneumophila*; *B. abortus*; *E. coli*, осложняющих постановку

точного диагноза. В данном случае отсутствие неспецифических взаимодействий дает возможность считать этот белок перспективным для серодиагностических исследований при туляремии.

3.4. Изучение иммунологической активности белка FTT1696 *F. tularensis*

Для изучения иммунологической активности белка FTT1696 кроликов породы Шиншилла (в количестве 2 шт.) весом от 1500 до 2000 г иммунизировали белком FTT1696 (0,5 мг/кг) подкожно двукратно на 28 сутки после первой иммунизации с неполным адьювантом Фрейнда в соотношении 1 : 1. Кроме того, еще двух кроликов иммунизировали однократно подкожно штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 5×10^9 м.к./кролика. На 0, 3, 7, 14, 21, 28-е сутки после введения препаратов у животных проводили забор крови для определения титров специфических антител в сыворотке к антигенам УЗД *F. tularensis* 15 НИИЭГ и белку FTT1696 методом твердофазного ИФА (Рисунок 10).

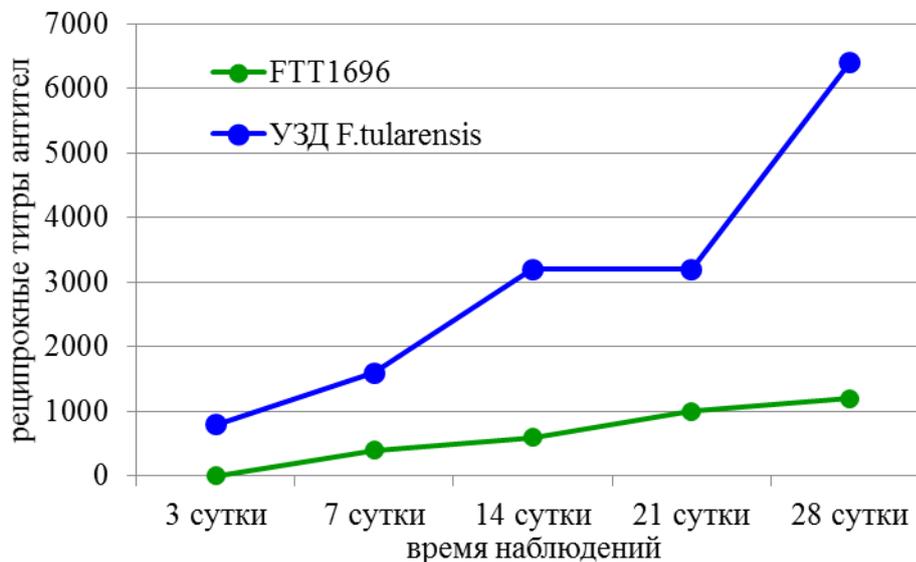


Рисунок 10 – Динамика нарастания титров специфических антител к антигенам туляремии микроба в пулированных сыворотках кроликов, иммунизированных белком FTT1696 или вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Данные ИФА, представленные на рисунке 10, свидетельствуют о том, что в сыворотках кроликов, иммунизированных вакцинным штаммом, наблюдали нарастание титров антител к УЗД с 3 дня наблюдений (1 : 800),

которые нарастают на протяжении срока наблюдений и к 28 дню были уже равны 1 : 6400, причем такие титры наблюдали в сыворотке обоих кроликов, свидетельствуя о хорошей иммуногенности туляремийного микроба для кроликов.

В сыворотке кроликов, иммунизированных белком FTT1696, напротив, титры были значительно ниже таковых для вакцинного штамма, что не удивительно при использовании для иммунизации белка, не относящегося к категории суперантигенов. Нарастание титров к белку FTT1696 начиналось только с 14 дня, и к концу срока наблюдений титры антител не превысили значений 1 : 6400.

Спектры специфических антител в полученных сыворотках к белкам УЗД и белку FTT1696 изучали методом иммуноблотинга (Рисунок 11).

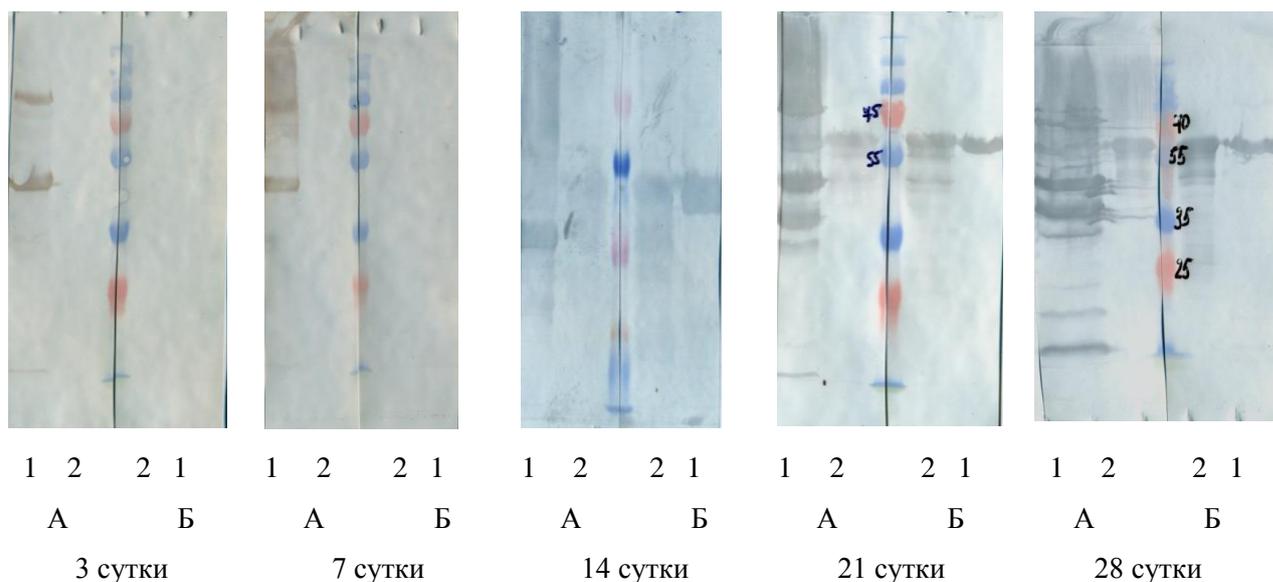


Рисунок 11 – Иммуноблот с сывороткой кроликов, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ(А) и рекомбинантным белком FTT1696 (Б). Примечание* 1- препарат УЗД штамма *F. tularensis* 15НИИЭГ; 2- рекомбинантный белок FTT1696

Данные иммуноблотинга (Рисунок 11) показывают, что в сыворотках кроликов, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ, уже на 3 день после вакцинации содержались антитела, связывающиеся с белками антигенного комплекса УЗД с молекулярной массой 88 кДа, 70 кДа и 44кДа.

В сыворотках кроликов, иммунизированных белком FTT1696, специфических полос обнаружено не было. Начиная с 7 дня после иммунизации, в сыворотке кроликов, иммунизированных вакцинным штаммом, появились антитела к УЗД, судя по наличию набора «зеброподобных» полос, в основном эти антитела были специфичны к липополисахару, антител, распознающих белок FTT1696, в это время (7 сутки) не наблюдали.

К 14 суткам у кроликов, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ, нарастает количество антител к ЛПС и некоторым белкам, в том числе появляются антитела и к белку FTT1696. В сыворотках кроликов, иммунизированных рекомбинантным белком FTT1696, к 14 суткам уже появляются антитела, взаимодействующие с очищенным рекомбинантным белком и выявляющие соответствующую по молекулярной массе ~ 58 кДа полосу белка в препарате УЗД.

На 21 и 28 сутки в сыворотках кроликов, как иммунизированных рекомбинантным белком FTT1696, так и штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ, присутствуют антитела, распознающие белок FTT1696 как в очищенном виде, так и в составе препарата УЗД.

Изучение динамики нарастания титра специфических антител к УЗД и белку FTT1696 в сыворотках крови кроликов, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ, в разные сроки после вакцинации проводили методом ИФА. Данные представлены на рисунке 12.

Установлено, что у кроликов, вакцинированных живой туляреминой вакциной, происходит нарастание титра антител к белку FTT1696 одновременно с нарастанием титра антител к УЗД *F. tularensis*, что позволяет рассматривать белок FTT1696 в качестве перспективного антигена для диагностических целей.

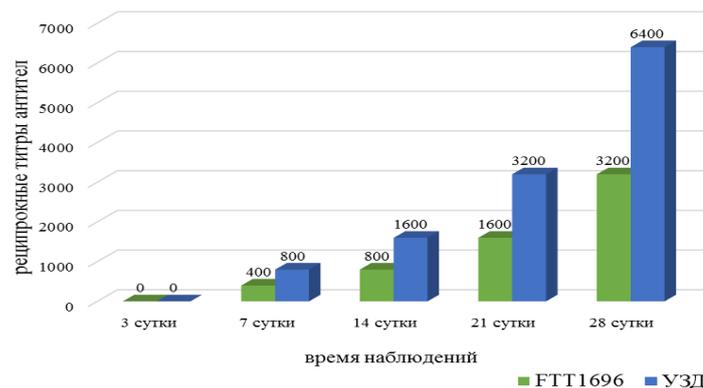


Рисунок 12 – Динамика нарастания титра специфических антител к антигенам туляремиального микроба у кроликов при иммунизации штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ

С целью выявления антител к белку FTT1696 были исследованы сыворотки людей, переболевших туляремией, людей, вакцинированных живой туляремиальной вакциной, мышинные сыворотки и сыворотки морских свинок после вакцинации и последующего заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* 503 и сыворотки крыс после заражения вирулентным штаммом. На рисунке 13 представлены результаты иммуноблотов с рекомбинантным белком FTT1696 индивидуальных сывороток людей и животных различных видов.

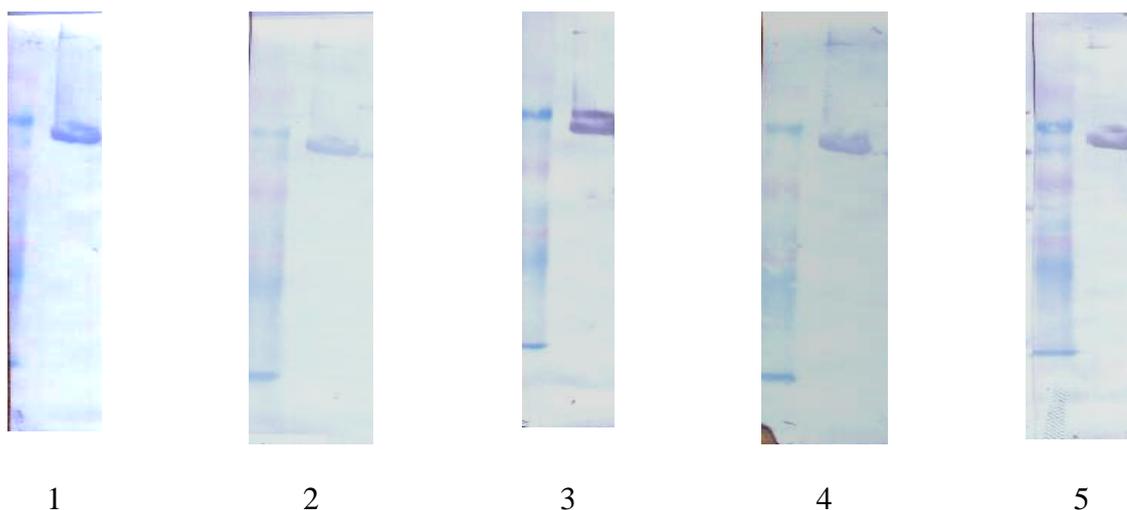
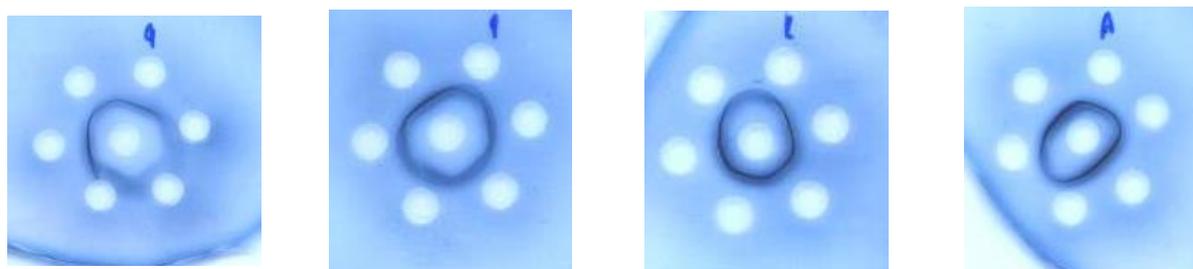


Рисунок 13 – Иммуноблоты рекомбинантного белка FTT1696 с иммунными сыворотками.

Примечание*1-сыворотка больного туляремией человека; 2-сыворотка человека, вакцинированного живой туляремиальной вакциной; 3-сыворотка мыши, вакцинированной живой туляремиальной вакциной и зараженной вирулентным штаммом *F. tularensis* 503; 4-сыворотка морской свинки, вакцинированной живой туляремиальной вакциной и зараженной вирулентным штаммом *F. tularensis* 503; 5-сыворотка крысы, зараженной вирулентным штаммом *F. tularensis* 503.

Полученные данные свидетельствуют, что у больных и вакцинированных людей и у всех видов исследованных животных в сыворотке крови обнаруживаются антитела к высокоспецифичному для туляремийного микроба белку-шаперону GroEL FTT1696.

Для подтверждения данных об иммуногенности белка FTT1696 были исследованы сыворотки мышей линии BALB/c, вакцинированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ в дозе 30 м.к./мышь и зараженных через 90 дней вирулентными штаммами *F. tularensis* различных подвидов. Сыворотки получали чрез 21 день после вакцинации и через 21 день после последующего заражения. Антитела к белку FTT1696 были исследованы иммуноферментным анализом, радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони. Титры антител к белку FTT1696 методом ИФА у вакцинированных мышей были от 1 : 200 до 1 : 400, после заражения иммунных мышей вирулентными штаммами различных подвидов, наблюдали повышение титров. Результаты реакции радиальной иммунодиффузии рекомбинантного белка FTT1696 с мышинными сыворотками представлены на рисунке 14



Вакцинный штамм

15НИИЭГ

Заражающие вирулентные штаммы *F. tularensis*

Schu (subsp.
tularensis)

503 (subsp.
holarctica)

A-678(subsp.
mediaasiatica)

Рисунок 14 – Реакция радиальной иммунодиффузии (по Оухтерлони) рекомбинантного белка FTT1696 (центральная лунка) с сыворотками мышей (по 6 мышей в группе – периферические лунки) иммунизированных и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* различных подвидов через 90 дней после вакцинации живой туляремийной вакциной.

Учитывая, что туляремийная инфекция на мышинной модели сопровождается выраженными симптомами интоксикации, полученные

результаты исследований сывороток мышей, свидетельствующие о наличии в ней антител к белку FTT1696, доказывают перспективность данного белка для серодиагностики туляремии, особенно в острой фазе заболевания.

3.5. Заключение по Главе 3

Полученный в ходе работы рекомбинатный белок FTT1696, согласно данным масс-спектрометрического анализа, оказался идентичен искомому белку GroEL FTT1696.

Электрофоретический анализ термолизатов представительного набора штаммов *F. tularensis* различных подвигов *subsp. tularensis*, (Schu, B-399 A-Cole), *subsp. holarctica* (503, A-1045), *subsp. mediasiatica* (120, A-678) и *subsp. novicida* (Utah112) показал, что во всех препаратах, полученных из лизатов бактериальных клеток вирулентных штаммов, имеется белковая полоса, соответствующая по молекулярной массе белку FTT1696 (58-60 кДа), а их белковые профили не отличаются от белкового профиля вакцинного штамма (Рисунок 8). Во всех образцах термолизатов штаммов различной подвиговой принадлежности методом иммуноблотинга выявлен нативный белок FTT1696, реагирующий с гипериммунной кроличьей сывороткой к рекомбинантному белку FTT1696. В биомассе термолизатов, приготовленных из клеток *L. pneumophila*, *B. abortus* и *E. coli*, взятых в качестве отрицательных контрольных образцов, белок, реагирующий с этой сывороткой, обнаружен не был (Рисунок 9). Эти результаты подтверждают литературные данные [160, 230] об отсутствии гомологии белка FTT1696 с белками бактерий других родов, что позволяет считать белок FTT1696 высокоспецифичным для туляремийного микроба и перспективным антигеном для серодиагностики туляремии.

При исследовании сывороток крови от больных туляремией и от вакцинированных против туляремии людей, а также экспериментальных животных (кроликов, крыс, морских свинок, мышей), вакцинированных и зараженных вирулентными штаммами, было показано, что в сыворотках

людей и всех видов лабораторных животных часто обнаруживаются антитела к белку FTT1696.

Показано, что у кроликов титры антител к этому белку обычно ниже, чем титры к антигену УЗД, однако имеют ту же тенденцию нарастания (Рисунок 12).

Отмечено, что более высокие титры антител к белку FTT1696 характерны для мышей, у которых даже введение вакцинного штамма в дозе 30 м.к./мышь, вызывает развитие инфекционного процесса. Это, вероятно, связано с тем, что синтез этого белка, являющимся белком теплового шока, в туляремийном микробе усиливается при симптомах интоксикации, сопровождающейся подъемом температуры. Это согласуется с данными зарубежных исследователей [160, 230], свидетельствующих, что антитела к этому белку характерны для острой фазы заболевания.

ГЛАВА 4. Диагностическая значимость антигенов *Francisella ssp.* для изучения иммунитета при поствакцинальном и постинфекционном процессе у людей и лабораторных животных

Периодические вспышки массовых заболеваний людей туляремией, сложность постановки клинического диагноза в спорадических случаях, сохранение эпизоотически активных природных очагов создают необходимость совершенствования лабораторной диагностики этой инфекции. В последнее время сложилось мнение, что для защиты от туляремийной инфекции необходимо формирование как клеточного, так и гуморального иммунного ответа [113, 175, 177, 226, 282]. Учитывая, что *Francisella tularensis* является внутриклеточным патогеном, клеточный иммунитет при туляремии является наиболее важным и эффективным защитным механизмом и оценка его напряженности является актуальной задачей, как при вакцинации, так и в клинической практике. Однако методы его оценки достаточно сложны, поэтому зачастую применяются только в исследовательских лабораториях.

В клинической и санитарно-эпидемиологической практике традиционными методами по оценке противотуляремийного иммунитета являются серологические реакции, направленные на обнаружение специфических антител, которые служат основанием для постановки предварительного диагноза у больного и оценки напряженности иммунитета вакцинированных людей. Кроме этого, определение противотуляремийных антител у животных имеет определенное значение для мониторинга эпизоотий туляремии. Учитывая, что в эндемичных районах проводится регулярная вакцинация против туляремии (только в 2010 г в Российской Федерации было вакцинировано 363 761 человек и ревакцинировано 1 299 153 человека) существует необходимость дифференцировать природу повышения титра специфических антител в каждом конкретном случае.

Одной из задач наших исследований была оценка использования антигенов *F. tularensis* для оценки гуморального и клеточного иммунитета у

вакцинированных и переболевших людей, и различных лабораторных животных, зараженных вирулентными штаммами *Francisella tularensis*.

Ранее сотрудниками Ростовского НИПЧИ было показано, что в случае инфекционного процесса специфические антитела связываются как с ЛПС *F. tularensis*, так и с ЛПС *F. novicida*, в то время как у вакцинированных специфические антитела связываются только с ЛПС *F. tularensis*.

4.1. Изучение клеточного иммунитета при вакцинации на мышинной модели туляремии

Как отмечено выше, изучение клеточного иммунитета при туляремии является актуальным, но зачастую в клинической практике его оценка сводится к постановке кожно-аллергических проб [16, 91, 124, 184, 185], что не всегда безопасно для людей. В связи с этим разработка и внедрение в практику достаточно простых и валидных методов по оценке клеточного иммунитета является насущным и своевременным. В работах зарубежных исследователей [113], для оценки клеточного иммунитета используют упрощенный метод определения продукции гамма-интерферона иммунокомпетентными клетками, стимулированными антигеном. В нашей работе мы оценили способность различных антигенов *F. tularensis* (УЗД, КНК, тулярин, ЛПС Ft, FTT1696) выступать в качестве специфических стимуляторов для иммунокомпетентных клеток у вакцинированных мышей.

4.1.1. Диагностическая значимость различных антигенов *F. tularensis* (УЗД, тулярин, КНК, ЛПС Ft, FTT1696) для оценки клеточного иммунитета при вакцинации

На момент начала наших исследований для изучения клеточного иммунитета использовали коммерческий препарат тулярин, представляющий собой взвесь туляремийного микроба вакцинного штамма *F. tularensis* 15НИИЭГ, убитого нагреванием, в растворе изотонического хлорида натрия (Омск, ФГУН НПО «Микроген» МЗ РФ), лабораторные образцы ультразвукового дезинтеграта (УЗД), приготовленные из взвеси туляремийного микроба вакцинного штамма, подвергнутой ультразвуковой

обработке. В дальнейшем был подготовлен образец кислото-нерастворимого комплекс *F. tularensis* (КНК), представляющего собой белково-липополисахаридную фракцию, полученную из осветленного лизата бактерий *F. tularensis* 15НИИЭГ в результате его закисления до pH 4,5. Полученные очищенные препараты ЛПС *F. tularensis* 15НИИЭГ (ЛПС Ft), и рекомбинантный белок *F. tularensis* 1696 (FTT1696) также использовали в качестве антигенов для изучения клеточного иммунитета.

Ранее изучение клеточного иммунитета проводили, используя реакцию бласттрансформации (РБТЛ) лимфоцитов, в основе которой лежит пролиферация лимфоцитов иммунизированных животных *in vitro* в ответ на стимуляцию специфическим антигеном. Учитывая данные зарубежных исследователей [113] и собственные исследования, мы стали применять метод оценки клеточного иммунитета по продукции гамма-интерферона иммунокомпетентными клетками в ответ на стимуляцию антигеном. Объектами изучения были мыши линии BALB/c, вакцинированные *F. tularensis* 15НИИЭГ подкожно и внутрикожно, и мыши, вакцинированные экспериментальными штаммами на основе штамма 15НИИЭГ с инактивированными генами с разной степенью аттенуации. Различные группы животных были исследованы с целью оценки возможных отличий в степени напряженности иммунитета при использовании различных антигенов туляремийного микроба. В качестве антигенов для стимуляции иммунокомпетентных клеток были взяты все вышеперечисленные антигены: тулярин, УЗД, КНК, ЛПС Ft и FTT1696.

Было показано, что различные способы введения вакцинного штамма имеют различную летальную дозу для мышей линии BALB/c, при этом иммунизирующая доза почти одинакова (Таблица 8).

Таблица 8 – Вирулентность и иммуногенность штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ при разных способах введения

Способы иммунизации <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	LD ₅₀ (КОЕ/мышь)	ED ₅₀ (КОЕ/мышь)
подкожный	79,0 (40÷110)	8,5 (1,8÷53,7)
внутрикожный	794,0 (251÷3162)	10,9 (2,8÷43,6)

Для изучения напряженности клеточного иммунитета животных иммунизировали подкожно в дозе 20 м.к./мышь или внутрикожно 200 м.к./мышь. Через 28 дней мышей (по 3 из группы) подвергали эвтаназии и получали спленоциты, которые культивировали *in vitro* с различными антигенами: тулярин, УЗД, КНК, ЛПС Ft, FTT1696. Через 48 ч отбирали супернатант и определяли количество содержащегося в нем гамма-интерферона коммерческими наборами (eBioScience (Австрия) методом ИФА.

Проведенный сравнительный анализ антигенов, способных стимулировать выработку гамма-интерферона иммунокомпетентными клетками вакцинированных мышей, который служит, по данным Eliasson Н. (2008) [113], показателем клеточного иммунитета, показал, что антигены – тулярин, УЗД, КНК – позволяют проводить оценку специфического клеточного иммунитета у вакцинированных мышей, поскольку вызывают повышение выработки этого цитокина, сравнимое с таким классическим неспецифическим стимулятором Т-клеток, как конконавалин А (Кон А) (Рисунок 15). В отличие от этих антигенов очищенные препараты – ЛПС Ft, FTT1696 – вызывают очень незначительное повышение синтеза гамма-интерферона иммунокомпетентными клетками. В качестве контроля служили не иммунизированные животные, иммунокомпетентные клетки которых реагировали только на Кон А. Достоверных различий между животными, иммунизированными разными способами (подкожным и внутрикожным), отмечено не было.

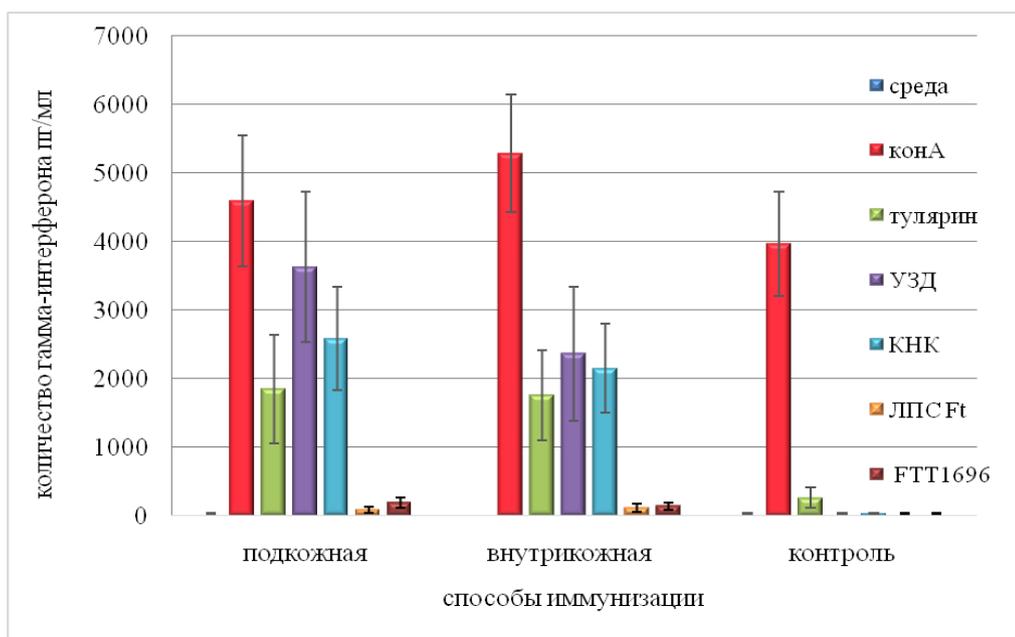


Рисунок 15 – Способность антигенов *F. tularensis* вызывать стимуляцию гамма-интерферона *in vitro* иммунокомпетентными клетками мышей иммунизированных различными способами штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ для оценки клеточного иммунитета

*Примечание** Доза иммунизации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 1×10^2 м.к./мышь.

Для дополнительного подтверждения эффективности использования указанных антигенов для оценки напряженности клеточного иммунитета исследовали мышей, вакцинированных штаммами с разной степенью аттенуации. Инактивация генов *iglC* (одной и двух копий), *rec A* и *recD* в вакцинном штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ изменяет степень остаточной вирулентности и иммуногенности штаммов (Таблица 9), и поэтому влияет на напряженность клеточного иммунитета. Защитные свойства штаммов оценивали по выживаемости мышей после их заражения бактериями *F. tularensis* 503 дозой 1×10^3 КОЕ/мышь (1000 DCL) (Таблица 9).

Таблица 9 – Вирулентность и иммуногенность штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его изогенных мутантов по генам *iglC* (одной и двух копий), *rec A* и *recD* для мышей линии BALB/c*

Штаммы <i>F. tularensis</i>	LD ₅₀ (КОЕ/мышь)	ED ₅₀ (КОЕ/мышь) для штамма <i>F. tularensis</i> 503
15 НИИЭГ	79,0 (40÷110)	8,5 (1,8÷53,7)
15/23-1	794,0 (251÷3162)	10,9 (2,8÷43,6)
15/23-2	>10 ⁹	нет защиты
15ΔrecA	$5,0 \times 10^3$ ($1,99 \times 10^3$ - $7,94 \times 10^4$)	15,5 (7,8÷73,1)

Продолжение таблицы 9

15ΔrecD	$5,0 \times 10^8$ ($2,51 \times 10^8 - 3,16 \times 10^9$)	915,3 (574,1 ÷ 1303,1)
---------	---	------------------------

*Данные предоставлены Комбаровою Т.И.

Полученные результаты свидетельствуют, что антигены – тулярин, УЗД, КНК – действительно позволяют оценить уровень напряженности клеточного иммунитета. Показано, что у животных, вакцинированных штаммами 15 НИИЭГ, 15/23-1 и 15ΔrecA, с низкой степенью аттенуации уровень стимулированного этими антигенами синтеза гамма-интерферона выше, в отличие от штаммов с большой степенью аттенуации (15/23-2 и 15ΔrecD). Это свидетельствует о выработке более напряженного клеточного иммунитета при иммунизации штаммами первой группы. Однако достоверных различий в действиях этих антигенов ни в случаях значительного повышения синтеза гамма-интерферона (для штаммов 15 НИИЭГ, 15/23-1 и 15ΔrecA), ни в случаях незначительного повышения синтеза этого цитокина (для штаммов 15/23-2 и 15ΔrecD) не наблюдали (Рисунок 16).

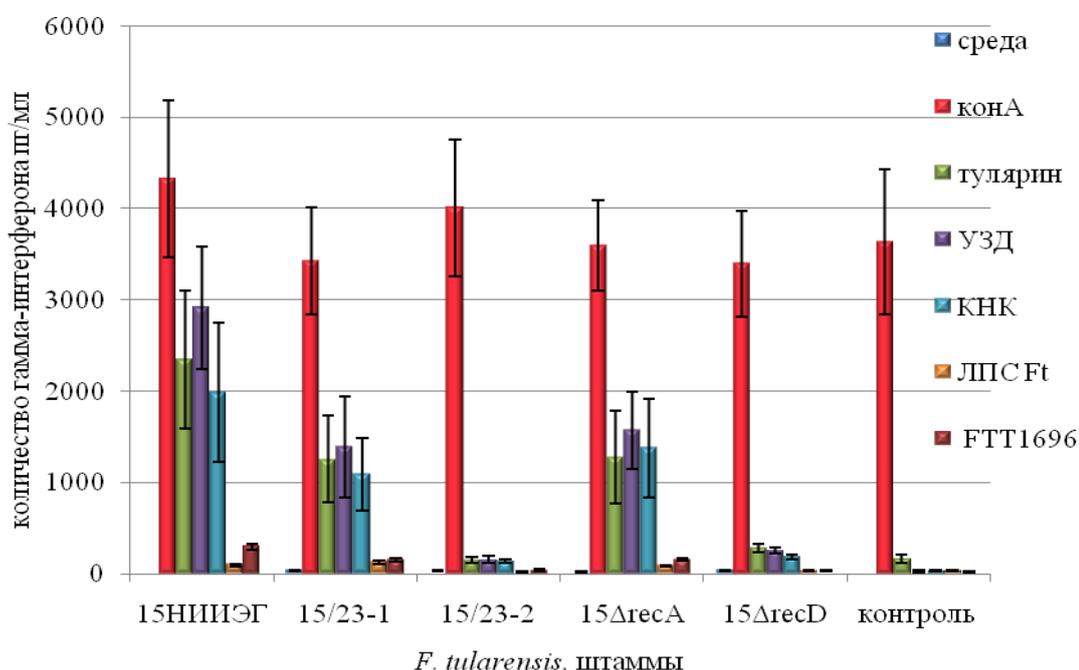


Рисунок 16 – Способность антигенов *F. tularensis* вызывать стимуляцию гамма-интерферона *in vitro* иммунокомпетентными клетками мышей, иммунизированных штаммами с различной степенью аттенуации для оценки клеточного иммунитета

Примечание*Доза иммунизации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, 15/23-1 и 15ΔrecA – 1×10^2 м.к./мышь, для штаммов 15/23-2 и 15ΔrecD – 1×10^5 м.к./мышь

Антигены – ЛПС Ft, FTT1696 – в различных группах вакцинированных животных вызвали незначительное повышение синтеза гамма-интерферона. Однако следует отметить, что если в группах вакцинированных животных штаммами с меньшей степенью аттенуации (15 НИИЭГ, 15/23-1 и 15 Δ recA) уровень синтеза этого цитокина отличался от группы не вакцинированных животных, то в группах животных, вакцинированных штаммами 15/23-2 и 15 Δ recD, уровень синтеза совершенно не отличался от контроля (Рисунок 16).

Таким образом, антигены туляремиального микроба – тулярин, УЗД, КНК – можно использовать в качестве специфического индуктора иммунокомпетентных клеток для оценки напряженности клеточного иммунитета. Все эти препараты представляют собой взвесь туляремиального микроба с различной степенью обработки или очистки. Мы не обнаружили достоверных различий при использовании их в качестве специфических антигенных индукторов иммунокомпетентных клеток, поэтому каждый из этих препаратов в зависимости от доступности может быть использован в системе *in vitro* в методиках по оценке клеточного иммунитета.

Очищенный липополисахарид туляремиального микроба – ЛПС Ft и рекомбинантный белок, теплового шока FTT1696 – не пригодны в качестве антигенов для оценки клеточного иммунитета.

4.2. Оценка антигенов туляремиального микроба для изучения гуморального иммунитета

Определение в сыворотке специфических антител к возбудителю туляремии на сегодняшний день остаётся самым распространённым методом лабораторной диагностики для подтверждения предшествующего контакта с возбудителем и оценки поствакцинального иммунитета.

Задачей наших исследований была оценка целесообразности использования различных антигенов *F. tularensis* для иммунодиагностических целей. В качестве антигенов для обнаружения специфических противотуляремиальных антител мы использовали

ультразвуковой дезинтеграции *F. tularensis* 15 НИИЭГ (УЗД), ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ (ЛПС Ft), ЛПС *F. novicida* (ЛПС Fn), рекомбинантный белок *F. tularensis* 1696 (FTT1696).

Предметом наших исследований было изучение наличия специфических антител к возбудителю туляремии в сыворотках людей

- переболевших туляремией;
- вакцинированных против туляремии;

Традиционный способ оценки поствакцинального и постинфекционного процессов включает определение титра специфических антител в сыворотке вакцинированных и заболевших в реакциях РА или РНГА. В качестве антигена при этом используется комплексный туляремийный антиген, представляющий собой взвесь убитых бактерий [64]. Однако зачастую интерпретация результатов этих тестов вызывает определенные трудности, что приводит к неправильной оценке инфекционного процесса и эффективности вакцинации.

Для диагностики туляремии актуально выявление в сыворотке крови больных и вакцинированных специфических антител IgG. С этой целью мы использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), метод двухступенчатого иммунохимического анализа, включающего скрининг сывороток в ИФА и последующее подтверждение результата в иммуноблотинге, метод дот-блота. Для оценки диагностической ценности используемых нами ИФА (ЛПС Ft) провели сравнение результатов с традиционно используемым методом оценки титров специфических антител - РНГА.

4.2.1. Сравнительный анализ иммунодиагностической значимости различных антигенов *F. tularensis* у людей, переболевших туляремией

Учитывая трудности с получением нашим центром сывороток людей, инфицированных и переболевших туляремией, количество образцов для данного исследования было ограничено. Были исследованы 6 сывороток людей, переболевших туляремией во время вспышки в Ханты-Мансийске в

2013 г. и четыре парные сыворотки от двух человек, перенесших туляремию в Ростовской области в 2017 году. Парные сыворотки были отобраны в разгар заболевания и спустя 10-14 дней. У всех заболевших наблюдалось повышение температуры и выраженное увеличение лимфатических узлов (лимфаденит).

Сыворотки исследовались методом твердофазного иммуноферментного анализа, в качестве антигенов использовали УЗД Ft, ЛПС Ft, рекомбинантный белок FTT1696 (Таблица 10).

Таблица 10 – Титры специфических антител к антигенам *F. tularensis* в сыворотках крови людей, больных туляремией

Номер донора	Титры антител к антигенам <i>F. tularensis</i>		
	УЗД	ЛПС <i>F. tularensis</i>	FTT1696
1 сыворотка	1 : 3200	1 : 3200	отриц
2 сыворотка	1 : 6400	1 : 3200	1 : 400
3 сыворотка	1 : 3200	1 : 3200	1 : 800
4 сыворотка	1 : 1600	1 : 800	отриц
5 сыворотка	1 : 3200	1 : 3200	отриц
6 сыворотка	1 : 6400	1 : 6400	1 : 800
Положительные сыворотки зараженных кроликов	1 : 6400	1 : 6400	1 : 800
	1 : 3200	1 : 1600	1 : 400
Отрицательные сыворотки доноров	1 : 400	отриц	отриц
	1 : 400	отриц	отриц

Специфичность антител, содержащихся в сыворотках 6 переболевших из Ханты-Мансийска, была подтверждена методом иммуноблотинга по взаимодействию с антигенами УЗД Ft, FTT1696 (Рисунок 17). В качестве отрицательного контроля использовались сыворотки доноров со станции переливания крови (ЦРБ, Серпухов), в качестве положительного контроля –

сыворотки 2 кроликов, зараженных вирулентным штаммом *F. tularensis* 503 голарктического подвида через 28 дней после заражения.

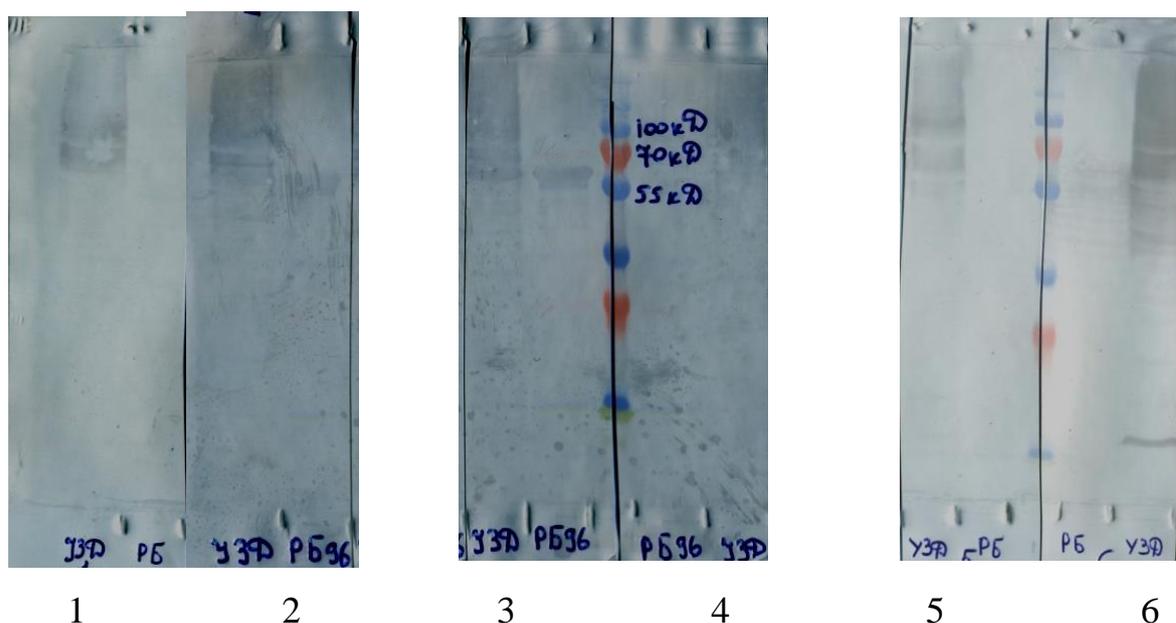


Рисунок 17 – Иммуноблот с сыворотками людей (1, 2, 3, 4, 5, 6), переболевших туляремией во время вспышки в Ханты-Мансийске в 2013 г., к рекомбинантному белку FTT1696 и УЗД *F. tularensis*.

Данные, представленные в таблице 10, показывают достаточно высокую концентрацию специфических антител в сыворотках переболевших. Титры АТ к УЗД Ft в некоторых случаях на одно разведение выше, чем к ЛПС Ft, однако значения оптической плотности (ОП) отрицательных контрольных сывороток в реакции с УЗД Ft в разведениях 1:200 значительно выше, чем в реакции с ЛПС Ft (~0,2 с УЗД; ~0,1 с ЛПС), что свидетельствует о большей степени неспецифических взаимодействий с УЗД Ft, чем с ЛПС Ft. Антитела к рекомбинантному белку FTT1696 в некоторых случаях не были обнаружены, а в случаях обнаружения титры были в 4-8 раз ниже, чем к УЗД Ft и ЛПС Ft. Выявление антител к белку FTT1696 только у 50 % переболевших связано, вероятнее всего, либо с поздними сроками отбора сывороток после начала заболевания, когда титр антител, специфичных к этому белку, уже снижается, либо с отсутствием выраженных симптомов интоксикации, либо с ранними сроками начала антибиотикотерапии. Кроме того, малое число доступных для анализа сывороток (малая выборка), возможно, не отражает истинное значение

наличия антител к этому белку. Полученные результаты, тем не менее, не умаляют диагностической значимости этого высокоспецифичного белка туляремийного микроба.

Специфичность взаимодействия рекомбинантного белка FTT1696 с сыворотками людей, переболевших туляремией, подтверждена в иммуноблотинге. Те сыворотки (№2, №3, №6), в которых методом ИФА выявлен титр антител к этому белку 1 : 400 – 1 : 800, в иммуноблоте дали полосы различной интенсивности, соответствующей белку FTT1696 (~58 кДа). Наличие специфических антител к УЗД Ft наблюдается во всех образцах, что подтверждает данные ИФА.

4.2.2. Сравнительный анализ иммунодиагностической значимости различных антигенов *F. tularensis* при вакцинации

В 2012 году в наш Центр для исследования поступили 100 сывороток от вакцинированных людей из эндемичных по туляремии районов Тульской области. Среди них 78 человек были вакцинированы однократно, 22 человека были ревакцинированы. В данной выборке наибольшее количество людей было в возрасте 50-59 лет – 35%, в возрасте 40-49 лет – 22%, 30-39 лет -17%, 60-69 лет – 14%, 20-29 лет -11% и одному из вакцинированных было 76 лет.

В соответствии с МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией» сыворотки рекомендуется первоначально исследовать параллельно в двух лунках в разведении 1 : 200 с последующей раститровкой положительных сывороток для определения титра антител, используя 2-кратные разведения сывороток. Этот прием был нами использован в ИФА с УЗД *F. tularensis* 15 НИИЭГ, поскольку этот антиген включает весь комплекс антигенов, присутствующих в туляремийном микробе. Учитывая, что задачей нашего исследования являлось определение иммунодиагностической значимости полученных нами очищенных антигенов туляремийного микроба – ЛПС Ft и FTT1696, сыворотки крови вакцинированных людей были исследованы и с этими антигенами. Специфичность реакций, полученных в иммуноферментном анализе, была подтверждена методом иммуноблотинга.

Такой метод двухступенчатого иммунохимического анализа, включающего скрининг сывороток в ИФА и исследование сывороток методом иммуноблотинга, рекомендован исследователями, занимающимися изучением туляреминого иммунитета [252].

При сравнении результатов ИФА наиболее близкими по значениям были титры к УЗД и ЛПС Ft (Рисунок 18). Титры антител к белку FT1696 были обнаружены только у 60 % вакцинированных, что, вероятно, обусловлено достаточной низкой реактогенностью вакцины, тем не менее, в 28% случаев титр антител составлял 1 : 400, а в 11% – 1 : 800, что еще раз подтверждает хорошую диагностическую значимость данного белка (Рисунок 18).

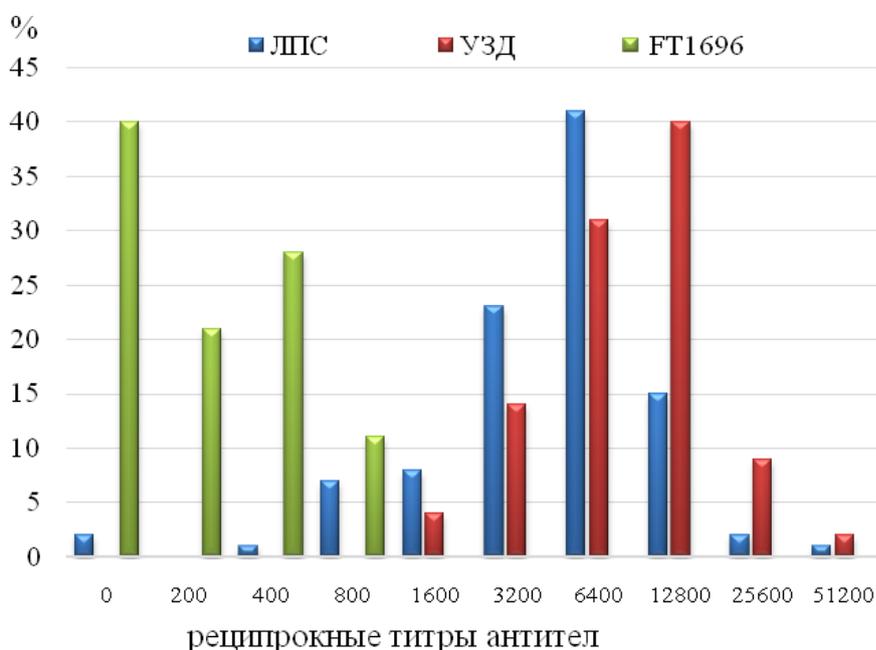


Рисунок 18 – Соотношение сывороток (%) с реципрокными титрами к соответствующим антигенам туляреминого микроба среди вакцинированных людей в Тульской области

Титры антител к УЗД в целом были выше, чем титры к ЛПС Ft (Рисунок 19). В 67 % случаев они были выше в 2 и более раз, тем не менее, в 2% случаев при положительных титрах к УЗД не были обнаружены АТ к ЛПС Ft.

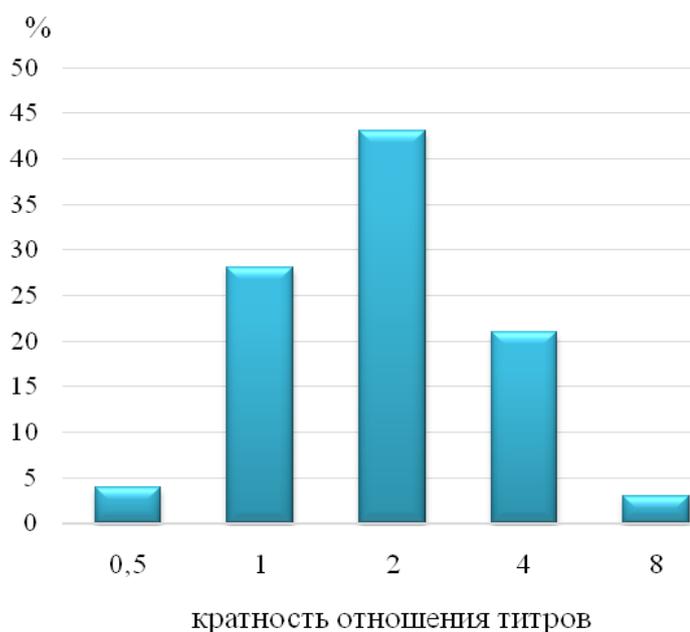


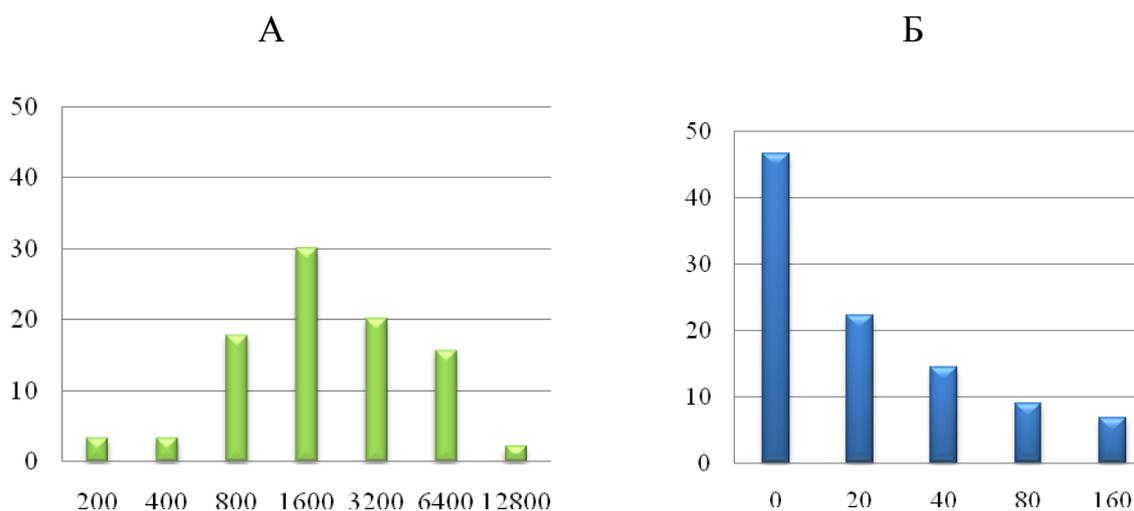
Рисунок 19 – Доля сывороток (%) с различной кратностью отношения титров антител к УЗД/ЛПС среди вакцинированных людей в Тульской области

4.2.3 Сравнительный анализ результатов серологических исследований при мониторинге эффективности вакцинации против туляремии в Алтайском крае

Нами были исследованы 90 сывороток людей, проживающих в эндемичных по туляремии районах Алтайского края и вакцинированных туляремийной вакциной. Напряженность гуморального иммунитета исследовалась традиционным методом – в РНГА с антигенным эритроцитарным туляремийным диагностикумом ("РНГА – Тул-Аг-СтавНИПЧИ"), методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием в качестве антигена ЛПС Ft.

Оценку напряженности гуморального иммунитета проводили спустя год после вакцинации. Среди вакцинированных были люди разных возрастных групп: 58-66 лет – 12,2%; 47-56 – 25,6%; 37-46 – 25,6%; 30-36 – 16,7%; 21-27 – 6,7% и подростков в возрасте 13-17 лет – 13,3%

Результаты оценки титров специфических антител в РНГА и ИФА представлены на рисунке 20.



Реципрокные значения титров специфических антител

Рисунок 20 – Соотношение сывороток (%) с соответствующими титрами среди вакцинированных людей в Алтайском крае

*Примечание**А – титры антител, определенные методом ИФА с использованием ЛПС Ft в качестве антигена; Б – титры антител, определенные методом РНГА с антигенным эритроцитарным туляремиальным диагностикумом

Результаты исследований показали, что при оценке титров антител методом ИФА с использованием в качестве антигена ЛПС Ft 93,3 % исследованных сывороток из представленной выборки дали положительные титры, и только в 6,7 % случаев сыворотки дали отрицательный результат, в то время как в РНГА в 46,7 % сывороток оказались отрицательными. Представленные на рисунке 20 данные демонстрируют, что разброс значений титров определенных методом ИФА, имеет нормальный тип распределения (распределение Гаусса) – 30 % исследованных сывороток имели титр 1 : 1600, 17,8 % - 1 : 800, 20 % - 1 : 3200 (Рисунок 20А). В случае определения титров методом РНГА (из 53,3% положительно прореагировавших сывороток в 22,2 % случаев отмечен титр 1 : 20, в 14,4 % - 1 : 40, в 8,9 % – 1 : 80 и в 6,7 % – 1 : 160), т.е. разброс значений не имел нормального распределения, что не характерно для биомедицинских показателей (Рисунок 20Б).

Попытка найти корреляцию между значениями титров специфических антител, полученными в РНГА и ИФА, не позволила обнаружить логических закономерностей. И только анализ данных по возрастным группам показал,

что самые высокие средние значения титров антител в ИФА – 1 : 4655 и минимальное количество отрицательных результатов в РНГА – 8,3% мы наблюдали в подростковой группе от 13 до 17 лет, что свидетельствует о некой корреляции при оценке напряженности гуморального иммунитета обоими методами. Возможно, положительная иммунореактивность этой группы связана с особенностями детской иммунной системы или тем, что в этой группе вакцинация была первичной.

Сравнительный анализ полученных результатов свидетельствует, что традиционно используемый метод оценки гуморального иммунитета при туляремии – РНГА с антигенным эритроцитарным туляремиальным диагностикумом, не всегда позволяет качественно оценивать эффективность вакцинации населения, что, вероятно, связано с низкой чувствительностью тест-набора. Метод ИФА с использованием в качестве антигена ЛПС Ft обладает более высокой чувствительностью и специфичностью.

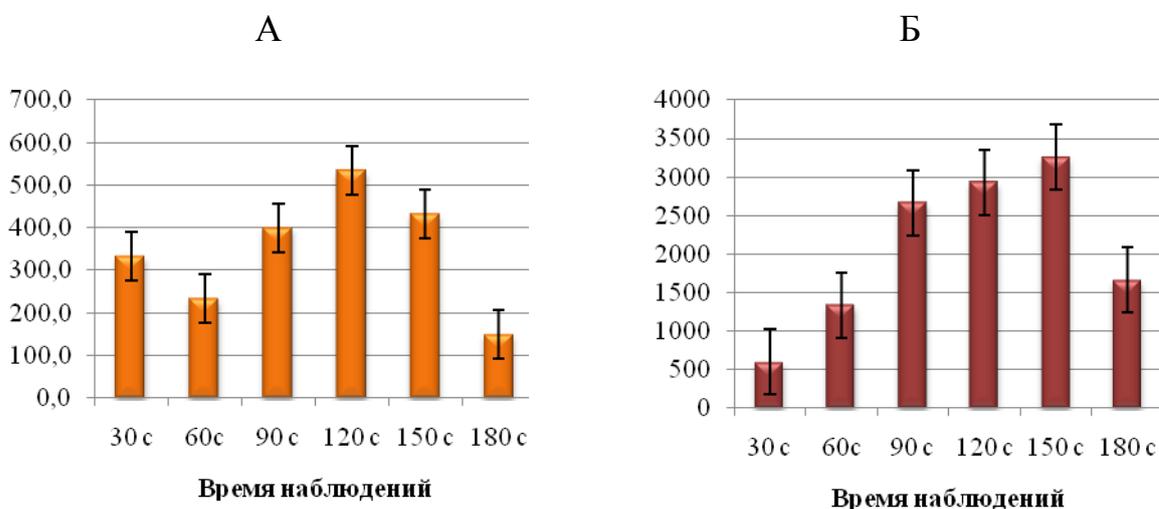
4.2.4. Особенности диагностической значимости антигенов туляремиального микроба при изучении гуморального иммунитета при поствакцинальном и постинфекционном процессе у лабораторных животных

Как отмечалось ранее, особенностью гуморального иммунитета при туляремии является появление в случае инфекционного процесса специфических антител, которые связываются как с ЛПС *F. tularensis*, так и с ЛПС *F. novicida*, в то время как при вакцинации специфические антитела к ЛПС *F. novicida* не выявляются. Ограниченное количество сывороток людей, переболевших туляремией, не позволяет ответить на вопрос, является ли обнаруженный феномен закономерностью при развитии гуморального иммунитета при инфекционном и вакцинном процессе. Поэтому нами были проведены эксперименты по моделированию процессов вакцинации и заражения вирулентными штаммами на лабораторных животных – мышах, морских свинках, крысах и кроликах с учетом их чувствительности к туляремии. Через 28 дней после вакцинации штаммом *F. tularensis*

15 НИИЭГ и через 28 дней после заражения вирулентными штаммами разных подвидов в сыворотке крови оценивали титры специфических антител к ЛПС Ft и к ЛПС Fn.

4.2.4.1. Изучение гуморального иммунитета высоковосприимчивых и высокочувствительных животных (мыши линии BALB/с и морские свинки) при вакцинации и заражении вирулентными штаммами разных подвидов

Для изучения иммунного процесса в динамике высоковосприимчивых и высокочувствительных к туляремии животных (мыши линии BALB/с и морские свинки) иммунизировали однократно подкожно вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ (мышей в дозе 30 м.к./мышь, морских свинок в дозе 500 м.к./морскую свинку). Для определения титра антител ЛПС Ft у мышей (по 3 в группе) в соответствующие сроки наблюдений (30, 60, 90, 120, 150, 180 сутки) проводили тотальный забор крови, у морских свинок проводили забор крови из ушной вены (Рисунок 21).



Реципрокные значения титров специфических антител

Рисунок 21 – Динамика изменения титра специфических антител к ЛПС Ft методом ИФА у лабораторных животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Примечание*А – мыши, иммунизированные п/к, в дозе 30 м.к./мышь; Б – морские свинки, иммунизированные п/к, в дозе 500 м.к./морскую свинку

Данные, представленные на рисунке 21, свидетельствуют, что в сыворотках вакцинированных животных происходит нарастание титров специфических антител у мышей до 120 суток и до 150 суток у морских свинок, причем у морских свинок он в среднем в 5 раз выше, чем у мышей. Используя метод иммуноблотинга и дот-блота специфические антитела к ЛПС F_n в сыворотках мышей линии BALB/c и морских свинок обнаружить не удалось, это согласуется с данными Ароновой Н. В.(2005) [1, 3]. У всех вакцинированных мышей были обнаружены антитела к белку FTT1696 в титрах от 1 : 200 до 1 : 400 в начальные сроки наблюдения (до 90 дня).

Для изучения гуморального иммунитета при инфекционном процессе мыши через 60 суток после вакцинации, а морские свинки через – 90 суток, были заражены вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*), *F. tularensis* 678 (subsp. *mediasiatica*), *F. tularensis* Schu (subsp. *tularensis*) в дозе 1000DCL – 1000м.к. на мышь и морскую свинку (по 5 животных в группе).

У мышей после заражения наблюдали падение веса, что свидетельствовало об инфекционном процессе, тем не менее, все животные выжили. Морские свинки, зараженные вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*), *F. tularensis* 678 (subsp. *mediasiatica*), так же теряли в весе и у некоторых животных наблюдали увеличение паховых лимфоузлов, но, как и мыши, к 28 дню восстановили вес, что свидетельствовало о выздоровлении. У морских свинок, зараженных вирулентным штаммом *F. tularensis* Schu (subsp. *tularensis*) наблюдали резкое падение веса и к 14 дню наблюдений они погибли. Таким образом, для исследований у нас было по 5 сывороток мышей после заражения вирулентными штаммами всех подвидов и сыворотки морских свинок после заражения вирулентными штаммами 503 и 678. Специфические антитела определяли методом ИФА к белку FTT1696, ЛПС F_t и дот-блотом с ЛПС F_t и ЛПС F_n (Таблица 11). Попытки обнаружить антитела к ЛПС F_n методом ИФА не увенчались успехом.

У всех морских свинок и мышей после заражения вирулентными штаммами в сыворотке крови были обнаружены АТ к белку FTT1696 в титре от 1 : 200 до 1 : 800. Титр специфических антител к ЛПС Ft после заражения вирулентными штаммами в мышинных сыворотках превосходил титр антител после вакцинации только в 2-8 раз. У морских свинок повышение титра антител после заражения более выражено и значительно превосходил титр антител в сыворотках мышей (8-250 раз) (Таблица 11).

Таблица 11 – Выявление специфических антител к ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ (ЛПС Ft), ЛПС *F. novicida* (ЛПС Fn) в сыворотках мышей линии BALB/c и морских свинок после заражения вирулентными штаммами разных подвидов

Вид животного	Заражающий штамм <i>F. tularensis</i>	Подвид заражающего штамма	Определение специфических антител			
			ИФА с FTT1696	ИФА с ЛПС Ft	Дот-блот с ЛПС Ft	Дот-блот с ЛПС Fn
Мыши линии BALB/c	503	<i>holarctica</i>	1:400	1:400	+	-
	503		1:800	1:400	+	-
	503		1:400	1:400	+	-
	503		1:400	1:800	+	-
	503		1:400	1:200	+	-
	678	<i>mediasiatica</i>	1:400	1:800	+	-
	678		1:400	1:400	+	-
	678		1:400	1:800	+	-
	678		1:800	1:800	+	-
	678		1:800	1:800	+	-
	Schu	<i>tularensis</i>	1:400	1:1600	+	-
	Schu		1:800	1:800	+	-
	Schu		1:400	1:800	+	-
	Schu		1:400	1:1600	+	-
	Schu		1:400	1:800	+	-
Морские свинки	503	<i>holarctica</i>	1:200	1:102400	+	+
	503		1:400	1:12800	+	+
	503		1:200	1:51600	+	+
	503		1:400	1:51600	+	+
	503		1:800	1:51600	+	+
	678	<i>mediasiatica</i>	1:800	1:6400	+	+
	678		1:200	1:51600	+	+
	678		1:400	1:12800	+	+
	678		1:400	1:6400	+	+
	678		1:200	1:51600	+	+

Оценка специфических взаимодействий с ЛПС Ft и ЛПС Fn методом дот-блота выявила интересную закономерность – с ЛПС Ft хорошо

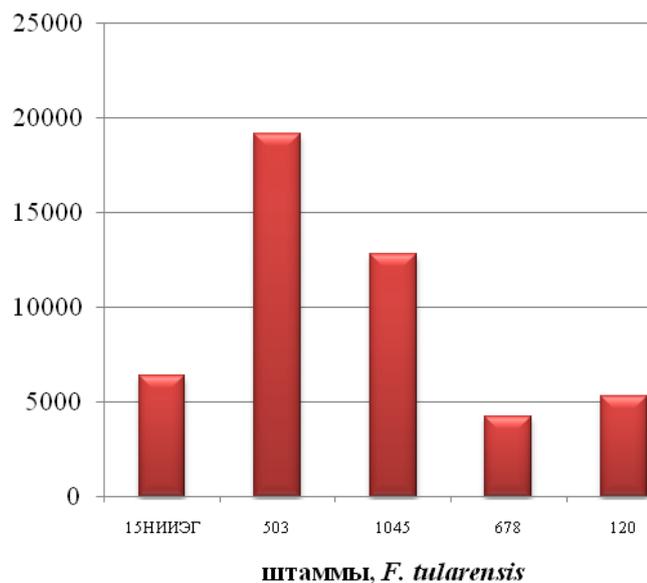
реагируют как сыворотки мышей, так и сыворотки морских свинок. В отличие от этого, ЛПС F_n четко реагирует с сыворотками переболевших морских свинок, и реакции связывания ЛПС F_n не наблюдается с сыворотками мышей, зараженных после вакцинации вирулентными штаммами трех подвидов – *holarctica*, *mediasiatica*, *tularensis* (Таблица 11).

4.2.4.2. Изучение гуморального иммунитета у высоковосприимчивых, но малочувствительных животных (кроликов породы Шиншилла и крыс линии Wistar)

Для изучения посвакцинального иммунитета кроликов породы Шиншилла (в количестве 2 шт.) весом от 2000 до 2500 г иммунизировали однократно подкожно в дозе 5×10^9 м.к./ кролика, крыс линии Wistar (в количестве 3 шт.) иммунизировали в дозе 1000 м.к./крысу вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Для изучения постинфекционного иммунитета кроликов без предварительной иммунизации заражали природными штаммами *F. tularensis* subsp. *holarctica* – 503 и 1045 и subsp. *mediasiatica* – 120 и 678, которые вводили подкожно дозе 5×10^4 м.к. на животное (2 кролика в группе) (Рисунок 22). Для заражения крыс использовали природные штаммы *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*), 678 (subsp. *mediasiatica*) и Schu (subsp. *tularensis*), которыми в первом эксперименте животных заражали после вакцинации (10^4 м.к./крысу по 3 животных в группе), во втором эксперименте – заражение проводили без предварительной иммунизации дозами 100, 1000 и 10000 м.к./крысу (по 3 животных в группе).

На 21 сутки после иммунизации и заражения у животных проводили забор крови для оценки титра антител к ЛПС F_t (Рисунок 22), а оценку специфичности взаимодействий с ЛПС F_t и ЛПС F_n проводили методом дот-блота (Рисунок 23).

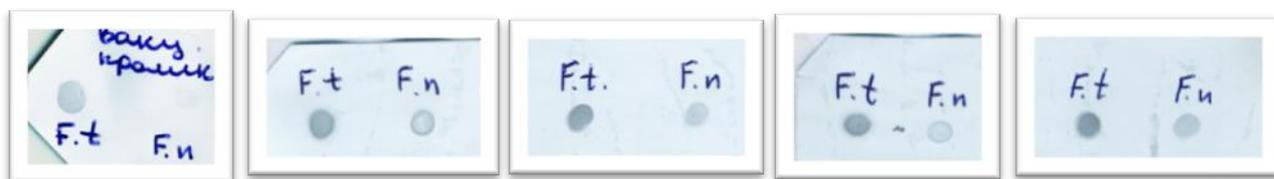


Реципрокные значения титров специфических антител

Рисунок 22 – Титры специфических антител к ЛПС Ft методом ИФА у кроликов породы Шиншилла, вакцинированных и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* разных подвидов

Представленные данные свидетельствуют (Рисунок 22), что кроликам, как при вакцинации, так и при заражении природными штаммами, присущи высокие титры специфических антител, что согласуется с данными Олсуфьева Н.Г. (1975) [42]. Следует отметить, что сыворотки, даже иммунизированных кроликов, имели высокий титр специфических антител (1 : 6400), заражение природными штаммами голарктического подвида приводило к повышению титра до 1 : 25600 (по отдельным животным), при заражении штаммами среднеазиатского подвида титры в среднем чуть ниже, что, возможно, связано с более тяжелым протеканием инфекционного процесса при заражении штаммами среднеазиатского подвида.

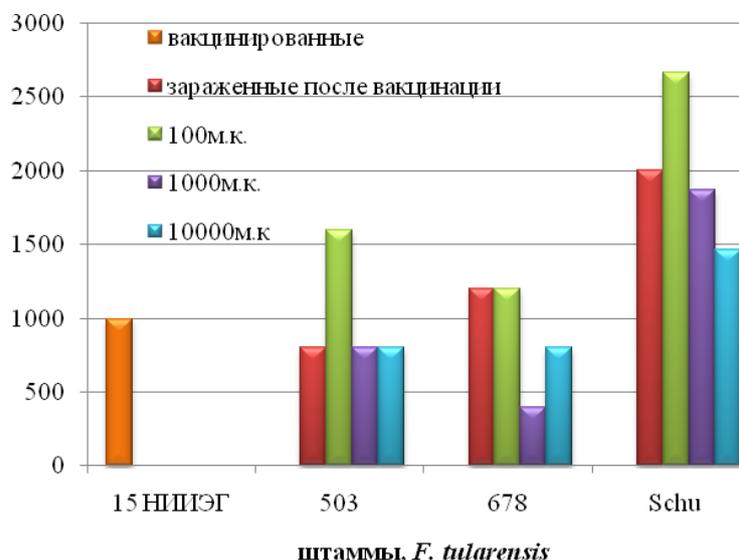
Изучение спектра антител методом дот-блота позволило обнаружить, что в сыворотке кроликов, зараженных вирулентными штаммами голарктического и среднеазиатского подвидов, появляются антитела, которые связываются как с ЛПС Ft, так и с ЛПС Fn. В сыворотке вакцинированных кроликов антител, реагирующих с ЛПС Fn, обнаружить не удалось (Рисунок 23).



15НИИЭГ	503	1045	678	120
---------	-----	------	-----	-----

Рисунок 23 – Дот-блоты сывороток кроликов, вакцинированных штаммом 15НИИЭГ и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* голарктического (503 и 1045) и среднеазиатского (678 и 120) подвидов с ЛПС Ft и ЛПС Fn

Для крыс характерны менее высокие титры антител до 1 : 1000 при иммунизации. Больше повышение титра антител вызывает штамм Schu (subsp. *tularensis*) при заражении вирулентными штаммами после вакцинации. При заражении вирулентными штаммами без предварительной вакцинации наиболее низкая заражающая доза вызывает наибольшее нарастание титра антител для всех подвидов *F. tularensis*. Возможно, острый инфекционный процесс вызывает некоторое угнетение антителообразования, которое к моменту взятия крови еще не достигло максимальных значений (Рисунок 24).



Реципрокные значения титров специфических антител

Рисунок 24 – Титры специфических антител к ЛПС Ft методом ИФА у крыс линии Wistar, вакцинированных и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* разных подвидов

Как у кроликов и морских свинок, заражение крыс вирулентными штаммами голарктического, среднеазиатского и неарктического подвидов

вызывает выработку антител, связывающихся как с ЛПС Ft, так и с ЛПС Fn, а при иммунизации вырабатываются антитела, имеющие эпитопы только ЛПС Ft (Таблица 12).

Таблица 12 – Дот-блоты сывороток крыс, вакцинированных штаммом 15НИИЭГ и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* голарктического (503), среднеазиатского (678 и 120) и неарктического подвидов (Schu) с ЛПС Ft и ЛПС Fn

<i>F.tularensis</i> , подвид		<i>F.tularensis</i> , штаммы	Доза заражения, м.к./крысу	Образцы сывороток, инфицированных крыс
<i>holarctica</i>	вакцинный	15НИИЭГ	10000	
	вирулентный	503	1000	
			10000	
<i>mediasiatica</i>	вирулентный среднеазиатский	120	1000	
			10000	
	вирулентный алтайский	678	100	
			1000	
			10000	
<i>tularensis</i>	вирулентный	Schu	100	
			1000	
			10000	

Таким образом, данные, полученные на лабораторных животных при экспериментальном заражении их вирулентными штаммами *F.tularensis* трех подвидов, свидетельствуют, что у кроликов, крыс и морских свинок происходит выработка антител, которые связываются как с ЛПС Ft, так и с ЛПС Fn. В случае иммунизации этих видов животных специфических взаимодействий иммунной сыворотки с ЛПС Fn не наблюдали, хотя сыворотки хорошо реагировали с ЛПС Ft. Однако, несмотря на большое количество экспериментов по заражению мышей вирулентными штаммами, нам не удалось обнаружить взаимодействия мышьиной сыворотки от зараженных животных с ЛПС Fn.

Эти результаты позволяют сделать несколько предположений по поводу появления антител способных взаимодействовать с ЛПС Fn у инфицированных:

- либо это связано с большим титром специфических антител, сопровождающих инфекционный процесс;
- либо при инфекционном процессе появляется иной спектр специфических антител, которые могут связываться и с ЛПС *F. novicida*;
- либо гидрофильная составляющая *F. novicida* имеет больше сходства с вирулентными штаммами *F. tularensis*, чем с вакцинным;
- либо имеет значение иммунная система макроорганизма

4.3. Заключение по Главе 4

Основной задачей представленной работы был анализ и выбор высокоспецифичных иммунодоминантных антигенов *F. tularensis*, универсальных для трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*), и оценка их диагностической значимости.

Для оценки клеточного иммунитета использовали коммерческий препарат тулярин, лабораторный образец ультразвукового дезинтеграта (УЗД), препарат КНК, рекомбинантный белок FTT1696 и очищенный препарат ЛПС *F. tularensis* (ЛПС Ft). Для изучения гуморального иммунитета использовали ультразвуковой дезинтеграт (УЗД), рекомбинантный белок FTT1696 и препараты ЛПС *F. tularensis* (ЛПС Ft) и *F. novicida* (ЛПС Fn).

Ранее для оценки клеточного иммунитета использовали реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), основанную на стимуляции лимфоцитов туляремиными антигенами [175, 176, 177, 235, 256, 259, 260, 261]. Недостатками этого метода были трудоемкость, использование радиоактивной метки, длительность исполнения. Недавно для оценки клеточного иммунитета стали использовать количественное определение секреции стимулированными лимфоцитами гамма-интерферона [113, 171, 172, 198], которое коррелирует с усилением пролиферации лимфоцитов в

ответ на специфический антиген.

Для получения более достоверной и объективной информации исследования проводили на различных группах вакцинированных мышей линии BALB/c. Клеточный иммунитет изучали при разных способах введения вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и при иммунизации экспериментальными штаммами на основе штамма 15 НИИЭГ с инактивированными генами с разной степенью аттенуации с целью оценки возможных отличий в степени напряженности иммунитета при использовании различных антигенов туляремиального микроба.

Результаты, полученные при изучении параметров клеточного иммунитета, свидетельствуют о том, что препараты тулярин, УЗД и КНК индуцируют выработку гамма-интерферона спленоцитами вакцинированных мышей примерно в равной степени (отличия не достоверны) и равноценно могут быть использованы в экспериментах по оценке напряженности клеточного звена иммунитета (Рисунки 15, 16). Тем не менее, следует отметить, что наибольший (без достоверных отличий) уровень синтеза этого цитокина у иммунных животных вызывает УЗД, препарат тулярин вызывает незначительную стимуляцию спленоцитов не иммунных животных (достоверно отличающуюся от иммунизированных мышей), препарат КНК более стандартизован, охарактеризован и может иметь (в отличие от УЗД) длительный срок хранения. Препараты рекомбинантного белка FTT1696 и очищенный ЛПС Ft мало пригодны для этой цели, поскольку очень слабо индуцируют продукцию гамма-интерферона спленоцитами (Рисунки 15, 16). При эффективной иммунизации (о чем свидетельствует ответ на тулярин, УЗД и КНК) синтез гамма-интерферона спленоцитами, стимулированными FTT1696 и ЛПС Ft, достоверно отличается от не иммунизированных животных. Тем не менее, количество цитокина при стимуляции спленоцитов препаратами FTT1696 и ЛПС Ft в 10 и более раз ниже (у иммунных животных), чем при использовании в качестве антигенов препаратов тулярина, УЗД и КНК. Таким образом, не вызывает сомнений, что для оценки

клеточного иммунитета лучше использовать антиген, представляющий собой обработанную взвесь цельных микробных клеток *F. tularensis*, что согласуется с данными Eliasson H. (2008) [113].

Хотя при диагностике туляремии оценка клеточного иммунитета является самым надежным методом специфической диагностики, тем не менее, в обычной практической медицине наиболее распространённым остаётся определение специфических антител к возбудителю туляремии в сыворотке крови. Традиционно в агглютинационных тестах для серодиагностики используются убитые цельные микробные клетки, однако в последние годы для выявления специфических антител чаще всего используют очищенный препарат ЛПС *F. tularensis* [95, 213, 234, 239, 251]. Однако в некоторых случаях антитела к этому антигену не обнаруживаются. Это может иметь место в начальной острой фазе заболевания, когда крайне важна установка диагноза. Поэтому, возможно, обнаружение антител к белку теплового шока FTT1696, обладающего высокой специфичностью и иммунореактивностью, может иметь большое диагностическое значение [173].

Таким образом, при изучении гуморального иммунитета мы проанализировали целесообразность использования для диагностики инфекционного процесса, вызываемого возбудителем туляремии, трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*) и поствакцинального иммунитета антигенов *F. tularensis* – УЗД, препаратов ЛПС Ft, ЛПС Fn и рекомбинантного белка FTT1696.

Для этих целей нами была собрана коллекция сывороток людей, переболевших туляремией и вакцинированных, а также сывороток лабораторных животных, вакцинированных и зараженных вирулентными штаммами различных подвидов. Количество сывороток людей, переболевших туляремией, в нашей коллекции, в силу объективных обстоятельств, было ограничено. Все они перенесли туляремию, вызванную возбудителем *F. tularensis* голарктического подвида. Лабораторных

животных (мышей, морских свинок, крыс и кроликов) заражали вирулентными штаммами разных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*). Вакцинацию, как людей, так и животных, проводили вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Результаты исследования сывороток переболевших туляремией людей свидетельствуют о том, что титры антител к УЗД и ЛПС Ft были либо одинаковыми (67 %), либо титры к УЗД в 2 раза превышали титры к ЛПС Ft (33 %), титры к рекомбинантному белку FTT1696 были от 1 : 400 до 1 : 800 и наблюдали только в 56% случаев (Таблица 10). Взаимодействие сыворотки людей, перенесших туляремию, с ЛПС Fn смогли зарегистрировать только методом дот блота тоже только в 56% (Таблица 10). Это согласуется с данными Павлович Н.В. (устное сообщение, не опубликованные данные), что антитела к ЛПС Fn обнаруживаются у заболевших или переболевших не во всех случаях. Специфичность взаимодействий сывороток, от переболевших людей, с УЗД и FTT1696 была подтверждена методом иммуноблотинга (Рисунок 17).

Коллекцию сывороток вакцинированных людей мы исследовали в два этапа. На первом этапе мы проанализировали диагностическую значимость препаратов УЗД, ЛПС Ft и FTT1696, используя метод двухступенчатого иммунохимического анализа, включающего скрининг сывороток в ИФА и исследование сывороток методом иммуноблотинга. Было показано, что по результатам ИФА наиболее близкими по значениям были титры к УЗД и ЛПС Ft (Рисунок 18). В случаях, когда результаты ИФА свидетельствовали об отсутствии АТ к ЛПС Ft, либо значения титров были 1 : 200 и ниже, провели оценку специфичности взаимодействий методом иммуноблотинга. Полученные результаты свидетельствуют, что, в случаях отсутствия АТ к ЛПС Ft в ИФА, титры к УЗД зачастую обусловлены неспецифическими взаимодействиями, что подтверждается результатами иммуноблотинга с контрольными Ig человека. Титры антител к белку FTT1696 были обнаружены только у 60 % вакцинированных, что, вероятно, обусловлено

низкой реактогенностью вакцины, тем не менее в 28% случаев титр антител составлял 1 : 400, а в 11% - 1 : 800 (Рисунок 18).

На втором этапе мы провели сравнительный анализ результатов серологических исследований традиционного метода РНГА и ИФА с использованием в качестве антигена ЛПС Ft. Было показано, что разброс значений титров, определенных методом ИФА, имеет нормальный тип распределения (распределение Гаусса). В случае же определения титров антител методом РНГА почти 47% сывороток дали отрицательный результат, разброс положительных значений не имел нормального распределения, что не характерно для биомедицинских показателей (Рисунки 20 А, Б). Эти данные позволяют говорить о высокой специфичности и хорошей диагностической значимости использования ЛПС Ft в качестве антигена.

Особый интерес представляют сыворотки животных, зараженных вирулентными штаммами разных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*). Мышей и морских свинок заражали после предварительной вакцинации, потому что LD₅₀ для вирулентных штаммов для этих высокочувствительных к туляремии животных составляет единичные клетки. Крыс заражали вирулентными штаммами как после предварительной иммунизации, так и не вакцинированных. Для заражения кроликов использовали вирулентные штаммы только двух подвидов *holarctica* и *mediasiatica*.

Наибольший интерес представляют данные, полученные при исследовании сывороток мышей линии BALB/c. У этого вида животных как после вакцинации (до 90 суток), так и после заражения в сыворотке определялись антитела к белку FTT1696, при этом антител к ЛПС Fn после заражения вирулентными штаммами обнаружить не удалось. Наличие АТ к ЛПС Ft после вакцинации наблюдали на протяжении полугода после однократной вакцинации, как у мышей, так и у морских свинок (Рисунки 21А, Б). После заражения вирулентными штаммами титр специфических АТ к ЛПС Ft в сыворотках мышей возрастал в 2-8 раз, а в

сыворотках морских свинок в 8-250 раз по сравнению с титрами антител после вакцинации (Таблица 11).

У мышей в отличие от всех остальных животных (морских свинок, кроликов и крыс) после заражения вирулентными штаммами всех трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*) наблюдали появление антител к ЛПС F_n, определяемые методом дот-блота (Таблица 12). Для крыс, которых заражали разными дозами вирулентных штаммов (от 100 до 10000 м.к./крысу), антитела к ЛПС F_n были обнаружены во всех сыворотках, независимо от дозы заражения (Таблица 12). Однако при иммунизации вакцинным штаммом 15 НИИЭГ ни у одного вида животных не были обнаружены антитела, взаимодействующие с ЛПС F_n (Рисунок 23, Таблица 12).

Тенденция нарастания титра антител для каждого вида животных при заражении вирулентными штаммами имела своеобразный характер. Так, для крыс и мышей были характерны менее высокие титры антител, чем для кроликов и морских свинок (до 1:1000) при иммунизации. При заражении вирулентными штаммами после вакцинации наибольшее повышение титра антител наблюдали у морских свинок и кроликов. Для крыс заражение штаммом Schu (subsp. *tularensis*) после вакцинации вызывает большее повышение титров антител, чем заражение штаммами подвидов *holarctica*, *mediasiatica*.

При заражении крыс вирулентными штаммами без предварительной вакцинации было обнаружено, что наиболее низкая заражающая доза вызывает наибольшее нарастание титра антител для всех подвидов *F. tularensis* (Рисунок 24). Заражение кроликов штаммами голарктического подвида вызывает большее повышение титра антител, чем заражение штаммами среднеазиатского подвида (Рисунок 22). Вероятно, острый инфекционный процесс, вызываемый большой дозой (у крыс) или введение более вирулентных штаммов (среднеазиатский для кроликов) вызывают

некоторое угнетение антителообразования, что обуславливает более низкие значения титров.

ГЛАВА 5. Создание и апробация иммунохроматографических тестов с антигенами туляремийного микроба для экспрессной серодиагностики туляремии

Иммунохроматографические тест-системы широко используются в медицине и ветеринарии, позволяя достоверно установить наличие в биоматериале как антигенов инфекционного агента, так и специфических антител к ним. Внедрение в массовую практику экспрессных диагностических тест-систем и организация их импортозамещающего производства рассматриваются, как приоритетные задачи развития отечественного здравоохранения.

Для ряда заболеваний основой постановки диагноза является серодиагностика. Формат иммунохроматографического анализа (ИХА) не требует специализированного оборудования, высокой квалификации персонала, может проводиться во внелабораторных условиях и позволяет получать результат за 10-15 мин. Значение экспресс-диагностики трудно переоценить, поскольку сужение спектра возможных причин заболевания и проведение качественной дифференциальной диагностики, основанной на проведении ИХА практически в любых условиях – одно из главных условий при постановке диагноза. Все эти факторы, безусловно, важны при диагностике такого инфекционного заболевания, как туляремия.

В 2011 году испанская компания Vircell представила на рынок иммунохроматографические тест-системы VIRapid® TULAREMIA для качественного определения общих антител против *F. tularensis* как в образцах сыворотки, так и в плазме. Наша работа по изучению антигенов возбудителя туляремии для использования в диагностике туляремии позволила нам подойти к решению задачи по созданию подобного ИХ-теста на основе ЛПС Ft в аспекте импортозамещающего производства. Кроме того, мы изучили возможность создания подобных тестов на основе дополнительных антигенов – рекомбинантного белка FTT1696 и ЛПС Fn. Наши исследования на модели экспериментальной туляремии с

использованием лабораторных животных позволяют считать, что ИХ-тест на основе рекомбинантного белка FTT1696 может быть использован при раннем выявлении спорадических случаев туляремии для дифференциальной диагностики лимфаденитов, сопровождающихся лихорадкой, а ИХ-тест на основе ЛПС Fp позволит различать постинфекционный и поствакцинальный иммунитет.

5.1. Разработка и создание иммунохроматографических тестов для выявления специфических антител в сыворотках для диагностики туляремии

Традиционная схема иммунохроматографической тест-системы для серодиагностики представлена на рисунке 25. В данной схеме ИХА используется конъюгат коллоидного золота (КЗ) с иммуноглобулин-связывающим белком (антивидовыми антителами, белком А *Staphylococcus aureus*, белком G *Streptococcus* spp. или другими реагентами для связывания иммуноглобулинов). Проба крови или сыворотки протекает через мембраны тест-системы.

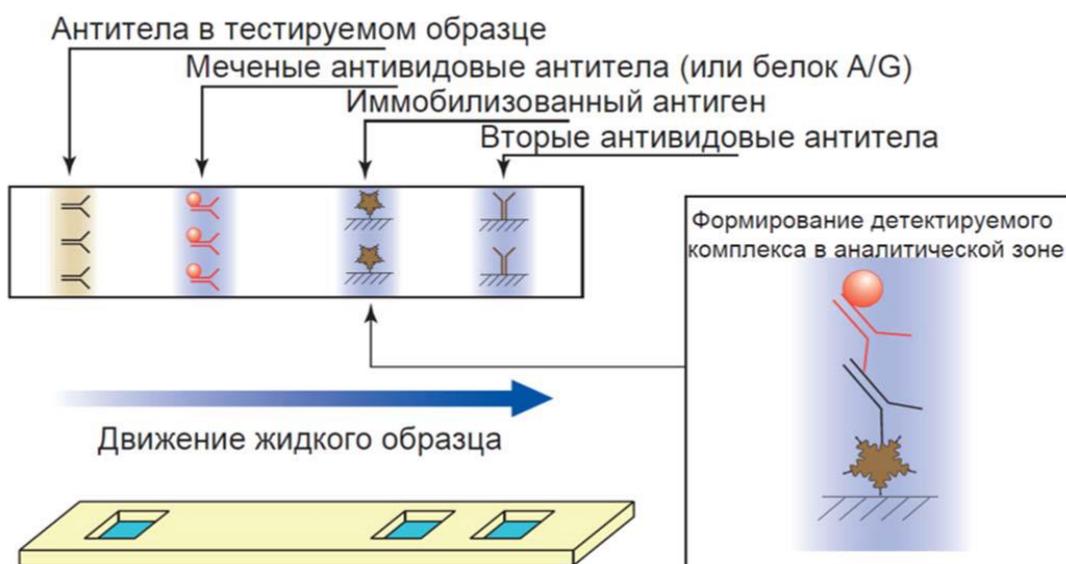


Рисунок 25 – Схема иммунохроматографического анализа в стандартном ИХ- тесте для серодиагностических исследований

На первой стадии происходит взаимодействие всех иммуноглобулинов в пробе с коллоидным конъюгатом. Затем фронт жидкости преодолевает аналитическую зону, которая представляет собой участок мембраны с иммобилизованным антигеном. Конъюгат КЗ с иммуноглобулин-связывающим белком взаимодействует с иммобилизованными молекулами антигена, в результате чего в аналитической зоне образуется тройной окрашенный комплекс. Степень связывания маркера с иммобилизованным антигеном и, соответственно, интенсивность окрашивания мембраны определяются концентрацией специфических антител в пробе.

По данным литературы, в качестве антигена для ИХ-тестов могут быть использованы как цельные бактериальные клетки, так и отдельные клеточные компоненты [14]. В предыдущей главе мы провели выбор антигенов туляремийного микроба, которые представляют собой диагностическую ценность. Результаты, полученные на животных, позволили нам рассматривать очищенные препараты ЛПС Ft, ЛПС Fn и рекомбинантный белок FTT1696 в качестве перспективных антигенов для серодиагностики и, в частности, для проведения иммунохроматографического анализа. Это позволило нам разработать дизайн ИХ-тестов, которые были бы полезны для оценки как наличия иммунитета к туляремии (ЛПС Ft), так и для раннего выявления спорадических случаев туляремии (FTT1696) и для дифференцирования постинфекционного и поствакцинального иммунитета (ЛПС Fn).

Конструирование иммунохроматографической тест-системы

Выбор материалов проводили, учитывая следующие параметры: сорбционная емкость мембран, однородность формирующихся аналитических и контрольных зон, равномерность продвижение фронта жидкости при анализе, а также уровень неспецифической сорбции золотоконъюгата на мембране. Для формирования контрольной зоны использовали кроличьи антитела против иммуноглобулинов мыши. Для формирования тестовой зоны использовали антигены *F. tularensis*. Растворы

антигенов в ФБР наносили диспенсером ("IsoFlow", ImagineTechnology, США) на нитроцеллюлозную мембрану 8 мкм в концентрации 0,5 мг/мл со скоростью нанесения 4 мм/сек и объемом 0,2 мкл/мм. В качестве стабилизирующих добавок использовали 10% глицерин, 1% БСА и 0,01% NaN₃. Раствор золотоконъюгата с белком G наносили на стекловолоконные фильтры со скоростью 8 мм/сек в объеме 1,6 мкл/мм.

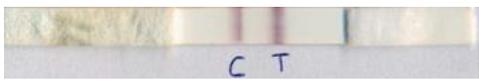
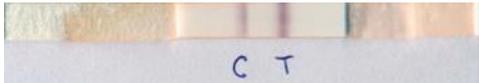
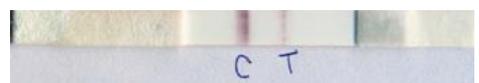
Для реализации ИХА по стандартной схеме мы использовали конъюгат белка G с КЗ (диаметр частиц 24 нм). ИХ-тесты готовили в трех вариантах – с препаратом ЛПС Ft, с ЛПС Fn или с рекомбинантным белком FTT1696, иммобилизуя в аналитической зоне тест-системы один из перечисленных антигенов. Мембраны после формирования аналитической и контрольной зон подклеивали к фильтру с золотоконъюгатом, сорбирующей и поглощающей подушечкам (MDI, Индия), а затем сушили на воздухе 25% влажности и при температуре 30 °С. Мембраны нарезали с помощью нарезчика стрипов (IndexCutter, Индия) на полоски шириной 0,5 см. Полоски герметично упаковывали и хранили до использования при температуре 4 °С.

Образцы антигенов наносили на нитроцеллюлозную мембрану в объеме 8 мкл в концентрации 0,5 мг/мл. Для контроля качества реагентов и сохранения функциональности тест-системы использовали контрольную зону, в которой иммобилизовали антитела кролика против иммуноглобулинов мыши. Изготовленные экспериментальные образцы тест-систем были протестированы на стандартных препаратах сывороток – сильноположительной, среднеположительной, пороговой слабоположительной и отрицательной сыворотках. Для сыворотки величина разведения в ИФА составляла 1 : 400. Соответственно, сыворотки, дающие в разведение 1 : 400 и более, учитывались, как положительные (Таблица 13).

Полученные результаты (Таблица 13) подтверждают достоверность диагностики с помощью разработанной тест-системы: наличие или отсутствие окрашивания аналитической зоны соответствует содержанию

антител в препаратах. Окрашивание аналитической зоны тест-системы при использовании сыворотки соответствовало пределу визуальной детекции.

Таблица 13 – Тестирование стандартных препаратов сывороток с использованием разработанной иммунохроматографической тест-системы

№	Типы стандартных образцов сывороток	Реакция в ИХ-тесте
1	сильноположительная сыворотка 1 : 12800	
2	среднеположительная сыворотка 1 : 3200	
3	слабоположительная сыворотка 1 : 400	
4	отрицательная сыворотка	

5.2. Апробация иммунохроматографических тестов для выявления специфических антител в сыворотках людей и экспериментальных животных для диагностики туляремии

Оценку активности и специфичности разработанных ИХ-тестов проводили, используя коллекции сывороток людей, вакцинированных живой туляремийной вакциной и переболевших туляремией, а также сывороток лабораторных животных различных видов (мыши, крысы, морские свинки, кролики), вакцинированных и зараженных вирулентными штаммами различных подвидов (*holarctica*, *mediasiatica*, *tularensis*). В качестве контроля были использованы сыворотки животных, иммунизированных к штаммам гетерологичных микроорганизмов *L. pneumophila*, *B. abortus*, *E. coli* и сыворотки интактных животных.

5.2.1. Апробация иммунохроматографических тестов для выявления специфических антител к липополисахариду *F. tularensis* 15 НИИЭГ (ЛПС Ft)

С целью апробации ИХ-тестов, в которых в качестве антигена был нанесен ЛПС Ft, были исследованы выбранные из коллекции сыворотки людей, переболевших и вакцинированных против туляремии (n=201) с разными значениями титров специфических антител, определенных методом ИФА. Все переболевшие перенесли заболевание, вызванное вирулентным штаммом *F. tularensis* голарктического подвида. Вакцинацию людей проводили штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ кожно-скарификационным методом нанесения. Все сыворотки предварительно были исследованы методом ИФА для определения титра специфических антител к УЗД и ЛПС Ft (глава 4). Полученные аналитические данные приведены на рисунке 26 и в таблице 14.

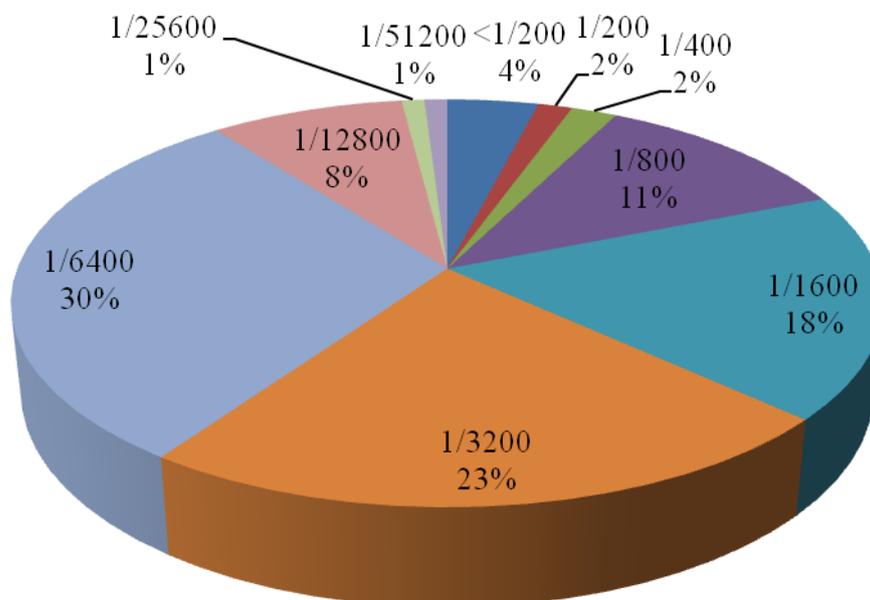


Рисунок 26 – Анализ распределения в коллекции сывороток (n=201) по титрам специфических антител к ЛПС Ft среди переболевших и вакцинированных людей (%)

Приведенные данные свидетельствуют о высокой чувствительности разработанного теста. Все сыворотки с титрами более 1 : 400 дали положительные результаты. В зависимости от количества антител (т.е. от значений титра в ИФА) изменялась интенсивность окрашивания аналитической зоны и время её появления (Таблица 14).

Таблица 14 – Тестирование коллекции сывороток (n=201) переболевших и вакцинированных людей с использованием разработанного ИХ-теста с ЛПС Ft

Количество сывороток (n) с соответствующим титром	Титр антител к ЛПС Ft методом ИФА	Время (мин.) появления полосы в аналитической зоне	Интенсивность окрашивания аналитической зоны
8	<1 : 200	–	–
3	1 : 200	–	–
4	1 : 400	25	±
23	1 : 800	25	+
36	1 : 1600	25	++
46	1 : 3200	15	+++
60	1 : 6400	10	++++
17	1 : 12800	2-5	++++
2	1 : 25600	2-5	++++
2	1 : 51200	2-5	++++

В коллекцию сывороток лабораторных животных были собраны сыворотки разных видов животных – мыши, крысы, морские свинки, кролики. К тому же, кроме сывороток животных, зараженных вирулентными штаммами голарктического подвида, были сыворотки животных, зараженных штаммами среднеазиатского и неарктического подвигов. Кроме того, исследовались смывы с сердец лабораторных животных, павших после заражения вирулентными штаммами в ходе экспериментов для определения наличия специфических антител к ЛПС Ft. В качестве контроля были использованы сыворотки животных, иммунизированных штаммами гетерологичных микроорганизмов *L. pneumophila*, *B. abortus*, *E. coli* и сыворотки интактных животных.

Как следует из результатов, изложенных в 4 главе, наименьшие значения титров специфических антител к ЛПС Ft определяли в сыворотках мышей, наибольшие – в сыворотках морских свинок и кроликов. Тем не

менее, во всех сыворотках вакцинированных и зараженных животных в случаях, если титр специфических антител, определенных методом ИФА был 1 : 400 и выше, ИХ-тесты позволяли регистрировать их наличие. Показатели времени и интенсивности окрашивания в аналитической зоне были сопоставимы с данными, полученными для сывороток людей. Контрольные образцы сывороток животных, иммунизированных штаммами гетерологичных микроорганизмов *L. pneumophila*, *B. abortus*, *E. coli*, и интактные сыворотки не давали полос окрашивания в аналитических зонах при наличии четких полос окрашивания в контрольных зонах.

Полученные нами положительные результаты использования ИХ-тестов для исследования смывов с сердец лабораторных животных, павших после заражения, убедительно свидетельствовали о возможности их использования в полевых условиях эпидемиологически активных очагов.

Таким образом, разработанные нами ИХ-тесты для определения специфических антител к ЛПС Ft в сыворотках людей и животных позволяют рассматривать их в качестве хорошего потенциального импортозамещающего продукта на отечественном рынке диагностических систем для серодиагностики туляремии, позволяющего уверенно конкурировать с иммунохроматографической тест-системой VIRapid® TULAREMIA испанской компании Vircell.

5.2.2. Сравнение чувствительности и специфичности экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуляремийных антител у людей

В ходе исследования было протестировано 109 сывороток крови людей (n=94 от вакцинированных против туляремии, n=15 здоровых доноров). Детекцию антитуляремийных антител в сыворотках крови проводили с помощью экспериментальных серодиагностических ИХ тест-системы на основе выделенного и очищенного препарата ЛПС Ft. Для определения валидности экспериментальной тест-системы в качестве эталонной референсной тест-системы была использована коммерческая ИФА тест-

система («ELISA classic *Francisella tularensis* IgG» (SERION, Германия). Для сравнения полученных экспериментальных данных были использованы результаты, полученные при исследовании тех же сывороток методом постановки РНГА с рекомендованным к применению коммерческим туляреминым серодиагностиком («РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ.

Результаты исследований представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты анализа сывороток крови вакцинированных и здоровых людей на наличие антитуляреминых антител различными диагностикумами

Тест-системы	Количество исследованных сывороток, (%)				
	вакцинированных против туляремии (n=94)			здоровых доноров (n=15)	
	Положительная реакция	Отрицательная реакция	Сомнительная реакция	Положительная реакция	Отрицательная реакция
Экспериментальный ИХ-тест	83 (88,3%)	11 (11,7%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (100%)
Коммерческий туляреминый диагностикум (РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ")	52 (55,3%)	42 (44,7%)	0 (0%)	3 (20%)	12 (80%)
Коммерческая ИФА тест-система (SERION, Германия)	88 (93,6%)	6 (6,4%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (100%)

Представленные данные (таблица 15) свидетельствуют, что экспериментальная тест-система обладает высокой степенью валидности. Количество положительных анализов, полученных с помощью экспериментального ИХ-теста отличается от данных референсной тест-системы на 5,7%. Отрицательные результаты на 5,3 % больше данных референсной ИФА тест-системы, что, вероятно, обусловлено высокими пороговыми значениями определяемых титров антитуляреминых антител от 1 : 400 и выше.

Полученные данные позволили оценить чувствительность и специфичность экспериментального ИХ-теста и РНГА относительно

коммерческой ИФА тест-системы («ELISA classic *Francisella tularensis* IgG» (SERION, Германия) (таблица 16).

Чувствительность оценивали, как способность диагностического метода давать истинный результат, и определяли, как отношение положительных результатов, определяемых экспериментальной тест-системой, к положительным результатам референсной тест-системы [7]. Соответственно, под специфичностью понимали способность диагностического метода не давать ложноположительных результатов [7]. Расчет относительной чувствительности проводили по формуле 1, а относительной специфичности по формуле 2:

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{N полож. тестируемых}}{\text{N полож. референс "SERION"}} \times 100\%, \text{ где: (формула 1)}$$

N полож. тестируемых – количество положительных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых экспериментальными серодиагностическими тест-системами;

N полож. референс «SERION» – количество положительных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых референсной системой «SERION».

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{N отриц. тестируемых}}{\text{N отриц. референс "SERION"}} \times 100\%, \text{ где: (формула 2)}$$

N отриц. тестируемых – количество отрицательных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых экспериментальными серодиагностическими тест-системами;

N полож. референс «SERION» – количество отрицательных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых референсной системой «SERION».

Таблица 16 – Чувствительность и специфичность экспериментального ИХ-теста и РНГА относительно чувствительности коммерческой ИФА тест-системы при выявлении антитюляремийных антител в сыворотках крови вакцинированных людей

Тест-системы	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
Экспериментальный ИХ-тест	94,3	100
Коммерческий туляремийный диагностикум (РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ")	59,1	80

Как видно из данных таблицы 16, при 100 % специфичности экспериментального ИХ-теста чувствительность составила 94,3 %. Напротив, чувствительность коммерческого туляремийного РНГА диагностикума оказалась низкой - всего лишь 59,1 % при специфичности в 80%, что еще раз свидетельствует об актуальности и своевременности постановки вопроса о необходимости разработки отечественных современных высокочувствительных и специфичных тестов. Наличие неспецифических результатов в РНГА может быть связано с тем, что для изготовления сенсibilизированных эритроцитов, как основного компонента РНГА, используют целые клетки туляремийного микроба, на поверхности которых имеется множество эпитопов, общих для целого ряда грамотрицательных микроорганизмов, в частности, бруцелл, иерсиний, эшерихий, обуславливающих существование перекрестных иммунологических реакции. Помимо этого, цельные микробные клетки с трудом поддаются стандартизации, что ухудшает воспроизводимость реакции от партии к партии производимого диагностикума.

Таким образом, сравнение чувствительности и специфичности экспериментального ИХ-теста и коммерческих серологических тестов («SERION» и РНГА), показало, что они по изученным характеристикам превосходят применяемые в настоящее время в нашей стране тесты РНГА и с учетом простоты проведения и быстроты получения результатов (30мин), имеет большие перспективы для широкого использования в эпидемиологических исследованиях.

5.2.3. Разработка иммунохроматографических тестов для выявления специфических антител к белку FTT1696 и липополисахариду *F. novicida* U112 (ЛПС Fn)

Результаты, изложенные в 4 главе, полученные на экспериментальных животных, позволили нам рассматривать очищенные препараты рекомбинантного белка FTT1696 и ЛПС Fn, как потенциально новые антигенные мишени, позволяющие выявлять специфические антитела для раннего выявления туляремии (белок FTT1696) и для дифференцирования постинфекционного и поствакцинального иммунитета (ЛПС Fn).

Результаты тестирования сывороток лабораторных животных позволили нам поставить задачу оценки целесообразности использования этих антигенов для ИХА. Было показано, что у мышей антитела к белку FTT1696 обнаруживались практически постоянно при исследовании сывороток как иммунизированных животных, так и сывороток животных, зараженных вирулентными штаммами. Это обусловлено тем, что мыши являются очень высокочувствительными к туляремии животными. Для них LD₅₀ вирулентных штаммов составляет единичные клетки, а LD₅₀ даже для вакцинного штамма 15 НИИЭГ по данным, полученным в нашем Центре, не превышает 100 микробных клеток, поэтому реакция мышей на введение *F. tularensis* практически всегда сопровождается повышением температуры. Принимая во внимание, что синтез белка теплового шока FTT1696 микробной клеткой повышается во время лихорадки, ИХ-тесты с белком FTT1696 в качестве антигена проверялись в основном на этой группе животных.

Кроме того, были протестированы сыворотки людей, переболевших туляремией, и вакцинированных от туляремии, имеющих антитела к белку FTT1696 (их количество составляло немного более 50% от всех исследованных). Следует отметить, что титры специфических антител к этому белку в сыворотках людей и мышей, определяемых методом ИФА, не превышали значений 1:800. В качестве положительных контрольных

сывороток для испытания ИХ-тестов с белком FTT1696 использовалась гипериммунная сыворотка кролика, который был иммунизирован очищенным препаратом рекомбинантного белка FTT1696 (глава 2). Результаты проведенных исследований приведены в таблице 17.

Таблица 17 – Тестирование коллекции сывороток вакцинированных и зараженных мышей (n=135), переболевших и вакцинированных людей (n=76) и сыворотки гипериммунного кролика с использованием ИХ-теста (FTT1696)

Вид животных	Количество сывороток (n) с соответствующим титром	Титр антител к FTT1696, определенный методом ИФА	Время (мин.) появления полосы в аналитической зоне	Интенсивность окрашивания аналитической зоны
мышь	25	1 : 200	–	–
	72	1 : 400	–	–
	38	1 : 800	30	±
люди	17	<1 : 200	–	–
	19	1 : 200	–	–
	29	1 : 400	–	–
	11	1 : 800	30	±
кролик	1	1 : 400	–	–
	1	1 : 800	30	±
	1	1 : 1600	20	+
	1	1 : 3200	15	++

Контрольные образцы сывороток мышей, иммунизированных штаммами гетерологичных микроорганизмов *L. pneumophila*, *B. abortus*, *E. coli*, и не иммунные сыворотки людей, мышей и кролика давали отрицательные результаты.

Результаты, представленные в таблице 17, свидетельствуют, что при высокой диагностической специфичности чувствительность ИХ-теста с FTT1696 требует дополнительной доработки. Следует дополнительно провести эксперименты по подбору оптимальных концентраций

адсорбируемого антигена и остальных компонентов тест-системы, которые обеспечат высокий уровень чувствительности, не приводя при этом к появлению ложноположительных результатов.

Подобные рассуждения о необходимости оптимизации разрабатываемых ИХ-тестов рассмотрены в работе Сотникова Д.В. [60], посвященной количественным закономерностям иммунохроматографических методов, в которой указывается, что, несмотря на интенсивные работы по разработке иммунохроматографических средств серодиагностики, многие вопросы их создания и функционирования по-прежнему остаются открытыми.

Другой антиген, который мы использовали для разработки ИХ-теста – ЛПС Fn. Интерес к этому антигену был вызван работой Ароновой Н. В. (2005) [1, 3]. В ней было предложено использовать его для дифференцирования постинфекционного и поствакцинального иммунитета.

Этот антиген был нами охарактеризован в 3 главе, где мы попытались найти объяснения антиген-антительных взаимодействий ЛПС Fn с сыворотками людей и животных, зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis*. Одна из трудностей, с которой мы столкнулись в процессе работы – это невозможность определения титра специфических антител в сыворотках методом ИФА на основе ЛПС Fn. Возможно, данная проблема была связана с необходимостью использования других условий адсорбции ЛПС Fn на полистироловом планшете, либо имеются другие причины, которые мы пока не смогли установить. Это требует проведения дальнейших исследований. Но, поскольку мы исследовали сыворотки дополнительно методом дот-иммуноанализа и получили положительные результаты с сыворотками животных, зараженных вирулентными штаммами (кроме мышей), и положительные результаты в 56% случаев с сыворотками людей, переболевших туляремией (глава 4), мы приняли решение все же разработать ИХ-тест с ЛПС Fn и апробировать его. Результаты апробации этих тестов полностью соответствовали результатам дот-блотов. Были изучены 58

сывороток лабораторных животных (крыс, морских свинок и кроликов) и 6 сывороток людей, переболевших туляремией. Во всех случаях результаты ИХ-тестов имели полное совпадение с результатами дот-блота. Следует отметить, что в сыворотках мышей, зараженных вирулентными штаммами, нам не удалось обнаружить антител к ЛПС F_n ни методом дот-иммуноанализа, ни ИХ-тестами с ЛПС F_n.

Таким образом, проведенная апробация вариантов ИХ-тестов с тремя вариантами туляремийных антигенов – ЛПС F_t, ЛПС F_n, FTT1696 – с использованием большой коллекции сывороток показала, что ИХ-тест на основе ЛПС F_t имеет достоверную серодиагностическую значимость для туляремии и необходимо провести испытание лабораторных образцов с целью расширения диагностически значимых отечественных тест-систем для серологических исследований на туляремию.

ИХ-тест на основе ЛПС F_n может служить хорошим дополнением при решении вопросов по дифференциальной диагностике постинфекционного и поствакцинального иммунитета при туляремии.

ИХ-тест на основе FTT1696 после доработки по оптимизации параметров компонентного состава тест-системы для повышения чувствительности в целом имеет обнадеживающие перспективы использования для ранней диагностики туляремии, особенно при изучении спорадических случаев, а также для дифференциальной диагностики лимфаденитов, сопровождающихся повышением температуры.

5.3. Заключение по Главе 5

Все работы по изучению антигенов *F. tularensis* различных подвидов имели своей конечной целью использование их для разработки и создания новых диагностических тест-систем для серодиагностики туляремии. На современном этапе иммунохроматографический анализ (ИХА) в наибольшей степени подходит на роль первичных серологических диагностических методов для скрининговых исследований случаев туляремии и для оценки поствакцинального иммунитета. Одним из существенных преимуществ ИХА

является возможность проводить диагностические исследования во внелабораторных условиях непосредственно на месте отбора анализов, позволяя существенно ускорить процесс получения результатов, расширяя, тем самым, возможности мониторинга инфекции.

В результате проделанной работы нами были разработаны и апробированы ИХ-тесты с охарактеризованными антигенами ЛПС Ft, FTT1696 и ЛПС Fn, которые были бы применимы для оценки наличия иммунитета к туляремии (ЛПС Ft), для раннего выявления спорадических случаев туляремии (FTT1696) и для дифференцирования постинфекционного и поствакцинального иммунитет (ЛПС Fn). Результаты анализа, изложенные в 5 главе, свидетельствуют, что, по нашему убеждению, разработанные нами ИХ-тесты с ЛПС Ft после проведения всех необходимых процедур по лицензированию могут быть рекомендованы для серологических исследований для диагностики туляремии при мониторинговых серологических исследованиях вакцинированных людей и для оценки эпидемиологической обстановки в природных очагах.

В случае имеющейся необходимости проведения дополнительных исследований по дифференциальной диагностике постинфекционного и поствакцинального туляремийного иммунитета могут быть использованы ИХ-тесты на основе ЛПС Fn.

ИХ-тесты с FTT1696 требуют доработки по повышению чувствительности, но, безусловно, могут иметь большое диагностическое значение в виду высокой специфичности данного белка для туляремийного микроба [173].

Заключение

Известно, что после перенесенной туляремийной инфекции или проведенной вакцинации у людей и животных через несколько недель формируется длительный протективный иммунитет [108]. Оценка напряженности иммунитета при вакцинации, его эффективность при возможном заражении, диагностика спорадических случаев заболевания туляремией требуют совершенствования её иммунодиагностики.

При современном развитии иммунодиагностических методов существует потребность в более качественных и достоверных диагностических инструментах для подтверждения диагноза туляремии. Одной из основных проблем иммунодиагностики туляремии является подбор антигенов, обеспечивающих высокий уровень специфичности анализа с надежным диагностическим критерием инфекционного или поствакцинального процесса. Именно поиск и изучение диагностического потенциала высокоспецифичных антигенов *F. tularensis*, позволяющих сократить сроки анализа при высокой достоверности результатов, является приоритетным направлением в научных исследованиях, касающихся диагностики туляремии.

При изучении антигенов, перспективных для диагностики туляремии, мы учитывали целесообразность использования их как для оценки клеточного, так и гуморального иммунитета. Мы изучали коммерческий препарат тулярин, лабораторный образец ультразвукового дезинтеграта (УЗД), препарат КНК, рекомбинантный белок FTT1696 и очищенные препараты ЛПС – ЛПС *F. tularensis*, ЛПС Ft и ЛПС *F. novicida*, ЛПС Fn.

Первые три препарата представляют собой взвесь туляремийного микроба, обработанную различными методами, сохраняющую практически весь набор антигенов, присущий живой микробной клетке *F. tularensis*: тулярин – это убитая нагреванием микробная взвесь в изотоническом растворе хлорида натрия; УЗД – взвесь, подвергнутая ультразвуковой обработке; КНК – осветленный лизат взвеси бактерий путем его закисления

до рН 4,5. Был проведен сравнительный анализ этих препаратов при использовании их в качестве специфических антигенных индукторов в системе *in vitro* при оценке клеточного иммунитета.

Белок FTT1696 был выбран в результате биоинформативного поиска, проведенного по базе данных белковых последовательностей NCBI, как диагностически значимый белок, имеющий высокую иммуногенность и специфичность [211]. Белок-шаперон GroEL FTT1696, являясь белком теплового шока, продукция которого микробной клеткой усиливается, вероятно, в острой фазе заболевания при выраженных симптомах интоксикации и гипертермии, поэтому антитела к нему могут иметь большое диагностическое значение. Одной из задач нашей работы было получение и очистка рекомбинантного белка FTT1696, оценка его иммунодиагностической значимости.

Другой высокоочищенный антиген, использованный в работе – это липополисахарид клеточной стенки *Francisella*, давно признанный одним из основных антигенов для выработки специфических противотуляреминых антител [229]. Наше внимание привлекли данные Ароновой (2005) [1, 3] о том, что антитела у людей, переболевших туляремией, в отличие от вакцинированных, могут связываться как с ЛПС *F. tularensis*, так и с ЛПС *F. novicida*. С этой целью мы занимались поиском возможных перекрестных специфичных антигенных детерминант у этих двух видов франциселл и провели сравнительный анализ иммуногенной специфичности ЛПС различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*).

Заключительным этапом нашей работы была разработка иммунохроматографических тестов для экспрессной серодиагностики туляремии на основе проведенного анализа по выбору высокоспецифичных иммунодоминантных антигенов *F. tularensis*, универсальных для трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*).

В ходе выполнения работы были получены данные, свидетельствующие о том, что рекомбинантный белок FTT1696, являющийся

аналогом белка теплового шока GroEL, обладает высокой специфичностью для *F. tularensis*. Данные зарубежных исследователей [160, 229] свидетельствуют, что антитела к этому белку характерны для острой фазы заболевания. Полученные нами результаты об обнаружении у экспериментальных животных (кроликов, крыс, морских свинок) при заражении вирулентными штаммами разных подвидов, а у мышей даже при вакцинации антител к белку FTТ1696 в острой фазе (начиная с 14 суток после инфицирования) заболевания могут свидетельствовать о диагностической важности антител к этому белку. При наличии клинических симптомов они могут служить дополнительным признаком, позволяющим диагностировать туляремию.

Исследования липополисахарида туляремиального микроба, являющимся главным антигенным компонентом его клеточной стенки, подтвердили данные других исследователей об особенностях туляремиального ЛПС, в частности, традиционное окрашивание серебром не позволяло выявлять структурные компоненты О-антигена с различным молекулярным весом. Учитывая, что в последние годы исследователи большое внимание уделяют капсуле, которая, по мнению некоторых, представляет собой полисахарид, идентичный О-антигену [77, 224], мы попытались найти взаимосвязь между толщиной капсулы штаммов различных подвидов и структурными составляющими ЛПС. Анализ результатов мягкого кислотного гидролиза препаратов ЛПС показал, что соотношение массовой доли липида А (гидрофобной) к массовой доле углеводной (гидрофильной) части различны для исследованных штаммов. Исследование толщины капсульного вещества методом электронной микроскопии показало, что для каждого штамма толщина капсульного слоя коррелировала с соотношением гидрофильной и гидрофобной части в препаратах ЛПС, полученных из этих же штаммов.

При выборе иммунодоминантных антигенов *F. tularensis*, универсальных для трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*), основной задачей была оценка их диагностической значимости. Традиционно считается, что для

туляремии существуют две формы иммунитета – клеточный [118] и гуморальный, поэтому лабораторная диагностика этого заболевания складывается из изучения клеточного и гуморального иммунитета.

Результаты, полученные при изучении клеточного иммунитета свидетельствуют, что препараты тулярин, УЗД и КНК индуцируют выработку гамма-интерферона спленоцитами вакцинированных мышей примерно в равной степени и равноценно могут быть использованы для оценки напряженности клеточного звена иммунитета. Препараты рекомбинантного белка FTT1696 и очищенный ЛПС Ft мало пригодны для этой цели, поскольку очень слабо индуцируют продукцию гамма-интерферона спленоцитами. Не вызывает сомнений, что для оценки клеточного иммунитета лучше использовать антиген, представляющий собой комплексный туляремийный антиген из цельных микробных клеток *F. tularensis*, что согласуется с данными Eliasson H. (2008) [113].

Несмотря на то, что оценка клеточного иммунитета является самым надежным методом специфической диагностики туляремии, в обычной практической медицине наиболее распространённым остаётся определение специфических антител в сыворотке. Традиционно для серодиагностики применяются агглютинационные тесты, в которых используются убитые цельные микробные клетки. Однако в последние годы для выявления специфических антител чаще всего выбирают очищенный препарат ЛПС *F. tularensis* [95, 213, 234, 239, 251]. В некоторых случаях антитела к этому антигену могут не обнаруживаться. Это особенно важно в начальной острой фазе заболевания, когда крайне важна установка диагноза. Большое диагностическое значение может иметь дополнительное исследование сыворотки на наличие антител к белку теплового шока FTT1696, обладающему высокой специфичностью и иммунореактивностью [229].

Нами была собрана коллекция сывороток людей, переболевших туляремией и вакцинированных (n=201), а также сывороток лабораторных животных, вакцинированных и зараженных вирулентными штаммами

различных подвидов (n=), которые были исследованы ИФА с УЗД, ЛПС Ft и FTT1696. Сыворотки людей, переболевших туляремией, и зараженных вирулентными штаммами животных исследовались методом дот-блота с ЛПС Fn. Результаты исследования сывороток показали, что титры антител к УЗД зачастую превышали титры к ЛПС Ft в 2-8 раза, однако проверка специфичности взаимодействий методом иммуноблотинга, свидетельствовала, что титры антител, определяемые к УЗД, зачастую обусловлены неспецифическими реакциями. Антитела к рекомбинантному белку FTT1696 всегда присутствовали в сыворотках зараженных вирулентными штаммами животных, но значения титров антител были невелики от 1 : 400 до 1 : 800, у людей, переболевших и вакцинированных, они наблюдались только в 50-60% случаев. Тем не менее, высокая специфичность данного белка позволяет рассматривать белок FTT1696 как перспективный антиген для диагностических целей, особенно как дополнительный антиген при диагностике sporadic случаев туляремии. Данные дот-блота с ЛПС Fn, полученные на экспериментальных животных, зараженных вирулентными штаммами, показывают его значимость для дифференциальной диагностики вакцинного и иммунного процессов.

Завершающим этапом этой исследовательской работы была успешная разработка и апробация ИХ-тестов с изученными антигенами ЛПС Ft, FTT1696 и ЛПС Fn. Создание диагностических тест-систем высокой чувствительности и специфичности открывает новые возможности для ускоренной серодиагностики туляремии даже во внелабораторных условиях, что, безусловно, является нужным и полезным, как для здравоохранения, так и для служб эпидемиологического надзора.

Выводы

1. В качестве антигенов для стимуляции иммунокомпетентных клеток при оценке напряженности клеточного иммунитета по уровню индуцированного гамма-интерферона при туляремии могут быть в равной степени использованы такие комплексные антигены бактерий *F. tularensis*, как ультразвуковой дезинтеграт, кислотонерастворимый комплекс и тулярин.

2. Оценку гуморального иммунитета при туляремии наиболее целесообразно проводить методом иммуноферментного или иммунохроматографического анализа с использованием липополисахарида *F. tularensis* в качестве антигена, дающих меньшее количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

3. На большой выборке сывороток лабораторных животных разных видов, инфицированных вирулентными штаммами, а также сывороток людей, переболевших туляремией и вакцинированных, получило подтверждение положение о том, что обнаружение антител к липополисахариду *F. novicida* может служить важным признаком для дифференциации инфекционного и вакцинального процессов у людей и животных, за исключением мышей линии BALB/c.

4. Обнаружение в сыворотке крови антител к высокоспецифичному белку *F. tularensis* FTT1696 может служить дополнительным основанием для постановки диагноза туляремии, начиная с острой фазы заболевания.

5. Коэффициент отношения гидрофильной и гидрофобной части в препаратах липополисахаридов штаммов *F. tularensis* различных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*) может служить критерием предварительной оценки толщины слоя капсульного вещества туляремийного микроба.

6. Успешная апробация разработанных ИХ-тестов на основе ЛПС Ft, ЛПС Fn и белка FTT1696 позволяет рассматривать их в качестве перспективных современных экспресс-систем для оценки иммунитета к туляремии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенных исследований доказывают необходимость широкого внедрения в практику разработанного и апробированного нами иммуноферментного анализа с использованием очищенного препарата липополисахарида *F. tularensis* в качестве адсорбированного антигена.

ИХ-тесты с липополисахаридом *F. tularensis* можно рекомендовать для мониторинговых эпидемиологических обследований природных очагов туляремии.

Рассмотреть вопрос о замене рутинных агглютинационных тестов на более простые ИХ-тесты, позволяющие проводить исследования на месте в ускоренном варианте и не требующие высокой квалификации персонала.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Будут продолжены исследования капсульного вещества и липополисахаридов клеточной стенки штаммов *F. tularensis* различных подвидов и *F. novicida*. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии планируется провести фракционирование выделенных препаратов с целью уточнения корреляции соотношения гидрофобной и гидрофильной части ЛПС и толщины капсульного вещества различных штаммов *F. tularensis* и *F. novicida*.

Провести дополнительные испытания ИХ-тестов с ЛПС F_n на сыворотках людей, болеющих или перенесших туляремию, с целью верификации данных тестов для дальнейшего использования их в лабораторной дифференциальной диагностике туляремии.

Провести клонирование других перспективных для иммунодиагностики белков туляремийного микроба для получения дополнительных антигенов, расширяющих возможности по созданию многокомпонентной системы для диагностики туляремии.

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ,
СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ**

АПК	- антиген презентующие клетки
АТ	- антитела
ГЗТ	- гиперчувствительность замедленного типа
ГИСК	- Государственный институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича
ГКПМ– Оболенск	- Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур – Оболенск
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИНИПЧИ СДВ	- Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока
ИФА	- иммуноферментный анализ
ИХ-тест	- иммунохроматографический тест
кДа (kDa)	- килодальтон
КНК	- кислото-нерастворимый комплекс
КОЕ	- колониеобразующая единица
ЛПС	- липополисахарид
М	- моль
м.к.	- микробная клетка
МКАТ	- моноклональные антитела
МПА	- мясопептонный агар
МФА	- метод флюоресцирующих антител
Н/Д	- нет данных
НИ	- настоящее исследование
НИИЭГ	- научно-исследовательский институт эпидемиологии и гигиены
ОП	- величина оптической плотности
ОФД	- о-фенилендиамина
п.о.	- пара (нуклеотидных) оснований
п/к	- подкожное введение
ПААГ	- полиакриламидный гель
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РА	- реакция агглютинации
РИФ	- реакции иммунофлуоресценции
РНК	- рибонуклеиновая кислота
п.о. (kb)	- тысяча пар нуклеотидных оснований (kilobase)
ФБУН ГНЦ ПМБ	- Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
УЗД	- ультразвуковой дезинтегратор микробных клеток
DMEM	- среда Игла в модификации Дульбекко
ED50	- доза иммунизации защищающая 50 % популяции животных зараженных DCL
FT	- среда для культивирования туляремийного микроба

<i>iglC</i>	- ген, отвечающий за размножение клеток <i>F. tularensis</i> в макрофагах
IL-12	- интерлейкин 12
IL-17	- интерлейкин 17
IL-1 β	- интерлейкин 1 β
IL-2	- интерлейкин 2
IL-23	- интерлейкин 23
IL-4	- интерлейкин 4
IL-6	- интерлейкин 6
<i>in vitro</i>	- эксперимент “в пробирке”, без использования животных
<i>in vivo</i>	- эксперимент на животных
LB	- среда Luria-Bertani
LD ₅₀	- летальная доза для 50 % популяции животных
LVS	- штамм <i>F. tularensis</i> со сниженной вирулентностью
PFGE	- (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) – гель-электрофорез в пульсирующем поле
<i>recA</i>	- ген, кодирующий белок RecA
<i>recD</i>	- ген, кодирующий α -цепь экзонуклеазы V

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Аронова, Н.В. Фазовые вариации липополисахарида возбудителя туляремии при инфекции и иммунизации человека / Н.В. Аронова, Н.В. Павлович // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 4. – С. 8-12.
- 2 Аронова, Н.В. Использование препаратов липополисахарида *Francisella tularensis* в точечном твердофазном иммуноферментном анализе / Н.В. Аронова, Н.В. Павлович // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2000. – № 5 – С. 75-78.
- 3 Аронова, Н.В. Липополисахариды бактерий рода *Francisella* как иммунодоминантные антигены и их фазовые вариации в условиях *in vivo* Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Н.В. Аронова. // Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. – Ростов-на-Дону. – 2005. – 23с.
- 4 Аронова, Н.В. Сравнительный анализ иммунного ответа кролика на антигены живых и убитых бактерий рода *Francisella* / Н.В. Аронова, Н.В. Павлович // Молекулярная генетика. – 2001. – № 2. – С. 26-30.
- 5 Бачинский, А.Г. Оценка влияния мер противодействия на последствия локальных эпидемий, вызываемых возбудителями особо опасных инфекций: изоляция/ А.Г. Бачинский, Л.Ф. Низоленко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 2. – С. 9-12.
- 6 Получение иммуномагнитных частиц для определения клеток *Francisella tularensis* / С.С.Ветчинин, П.Х. Копылов, Н.В. Киселева // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 109. – С. 50-53.
- 7 Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. Ю.А. Данилова; под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. - М.: Практика, 1998. – 459 с.
- 8 Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке на территории Ханты-Мансийского автономного округа – Югры в 2013

- году». – Управление Роспотребнадзора по ХМАО – Югре. – 2014.
- 9 Гузаева, Т.В. Получение меченных европием моноклональных антител к *F. tularensis* и их применение в иммуноанализе (DELFIA) / Т.В. Гузаева, А.М. Комаров, Г.К. Гречко // Актуальные проблемы профилактики туляремии: Тезисы докладов Всесоюзной конференции (15-17 октября 1991 г., г. Симферополь). – М. – 1991. – С. 45-46.
 - 10 Гузаева, Т.В. Белок *A Staphylococcus aureus*, меченный европием, как реагент для определения специфических антител / А.М. Комаров, С.В. Юров, С.Ю. Пчелинцев, А.В. Чудинов, С.С. Афанасьев, В.П. Завьялов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1994. – № 4. – С.59-63.
 - 11 Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – Санкт-Петерб., – 2010. – 48 с.
 - 12 Жарникова, И.В. Разработка суспензионного диагностикума для выявления возбудителя туляремии / И.В. Жарникова. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 1. – С. 67-69.
 - 13 Загоскина, Т.Ю. Использование белковолиполисахаридного антигена бруцелл, меченного частицами коллоидного золота, для обнаружения специфических антител методом дот-иммуноанализа / Т.Ю. Загоскина, А.И. Калиновский, Е.Ю. Марков, А.А. Докорина // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 3. – С. 39-41.
 - 14 Иванов, К.К. О-соматические и поверхностные антигены сальмонелл. / К.К. Иванов, А.С. Вершков // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов. - Щелково. – 2000. – С. 64-71.
 - 16 Калитина, Т.А. Кожная аллергическая реакция как показатель иммунитета при туляремии: дис. ... канд. мед. наук. / Акад. мед. наук СССР. – Москва – 1953. – 109 с.

- 17 Катунина, Л.С. Экспериментальная плотная питательная среда для культивирования легионелл / Л.С. Катунина, А.А. Курилова, Т.В. Таран, Ю.С. Ковтун, Н.В. Чурикова, А.А. Зуенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013 – № 1 – С.88-90.
- 18 Коллинза, У.П. Новые методы иммуноанализа /Под ред. У.П. Коллинза. - М.: Мир, 1991. – 280 с.
- 19 Коротяев, А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. – СПб.: СпецЛит, 2002. – 591с.
- 20 Кулеков, Н. Изучение процесса иммунизации при туляремии. Ультраструктура Т - лимфоцитов после прививки живой туляремийной вакциной / Н. Кулеков, Н. Шейков, Р. Маркова // Воен.- мед. дело. – 1989. – Т. 43(2). – С.40 - 45.
- 21 Куница, Т.Н. Классификации клинических форм туляремии // Материалы III съезда врачей и провизоров Казахстана «Конкурентоспособному Казахстану – здоровую нацию», г. Астана, 18-19 октября 2007 г.– Астана, 2007. – Т. II. - С.152-153
- 22 Лабораторная диагностика возбудителей опасных инфекционных болезней. /Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – Саратов, – 1998. – 251с.
- 23 Лившиц, Ю.И. Требования к качеству лабораторных грызунов и условия их содержания / Ю.И. Лившиц // Руководство по вакцинному и сывороточному делу. – М.: Медицина, 1978. – С. 24-36.
- 24 Маслова, Н.Н. Сравнительное изучение структуры липополисахаридов вирулентных и авирулентных штаммов *Francisella tularensis*. / Н.Н. Маслова, Н.В. Павлович // Гомеостаз и инфекционный процесс: Тезисы докладов международной конференции. – Саратов, 1996. – С.25.
- 25 Маслова, Н.Н. Характеристика структуры и антигенной активности липополисахаридов у разных видов *Francisella* / Н.Н. Маслова,

- Н.В. Павлович, В.М. Сорокин, В.А. Зурабян // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1998. – № 3. – С. 26-29.
- 26 Мещерякова, И.С. Использование иммуноферментного метода ELISA для выявления возбудителя туляремии / И.С. Мещерякова, Н.Г. Умнова, К.Л. Шаханина, И.П. Павлова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1988. – № 2. – С. 109-112.
- 27 Мещерякова, И.С. Система иммунологической диагностики при эпидемиологическом и эпизоотологическом исследовании на туляремию / И.С. Мещерякова, И.П. Павлова // 70 лет Моисею Иосифовичу Леви: Научные труды, посвященные юбиляру. – М., 1997. – С. 89-98.
- 28 Мещерякова, И.С. Таксономия, идентификация и иммунологическая диагностика возбудителя туляремии: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук: 03.00.07. / И.С. Мещерякова // – М., – 1990. – 47 с.
- 29 Мещерякова, И.С. Трансмиссивная эпидемическая вспышка туляремии в городе Ханты-Мансийске в 2013 году / И.С. Мещерякова, Т.Н. Демидова, А.А. Добровольский // Материалы Международной научной конференции 6-10 апреля 2014, г. Сургут – 2014. – С. 173-174
- 30 Мещерякова, И.С. Туляремия. В кн.: Природная очаговость болезней: исследования института Гамалеи РАМН / И.С. Мещерякова, под ред. Э.И. Коренберга. // М., 2003. – 254 с.
- 31 Мещерякова, И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика (К 80-летию создания первой туляремийной лаборатории в России) / И.С. Мещерякова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – Т. 2(51). – С. 17-22.
- 33 Мещерякова, И.С. Характеристика новых видов патогенных микроорганизмов рода *Francisella* / И.С. Мещерякова, М.И. Кормилицина, И.В. Родионова, П.Д. Константинова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1995. – №5. – С. 3-8

- 34 Мишанькин, Б.Н. Туляремия / Б.Н. Мишанькин, Н.В. Павлович, Л.В. Романова // Лабораторная диагностика возбудителей особо опасных инфекционных болезней. – 1998. – № 1. – С. 111-143.
- 35 МКБ 10 - Международная классификация болезней 10-го ...mkb-10.com
- 36 Мокриевич, А. Н. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края / А. Н. Мокриевич, В. С. Тимофеев, Т. Ю. Кудрявцева, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013 . – № 1. – С. 66-69.
- 37 Эпидемиологический надзор за туляремией МУ 3.1.2007 – 05: Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 9 сентября 2007 г.. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. - 85 с.
- 38 Некипелов, Н.В. Вспышки туляремии в СССР/ Н.В. Некипелов // Известия Иркутского Государственного противочумного института Сибири и Дальнего Востока – 1959. – Т. XX. – С. 133-145.
- 39 Никифоров, В.В. Туляремия: от открытия до наших дней/ В.В. Никифоров, Г.Н. Кареткина // Инфекционные болезни. – 2007. – Т. 5(1). – С. 67-76.
- 40 Олсуфьев, Н. Г. Природная очаговость, эпидемиология и профилактика туляремии/ Н. Г. Олсуфьев, Т.Н. Дунаева // Медицина. – 1970. – 269 с.
- 41 Олсуфьев, Н.Г. Внутривидовая таксономия возбудителя туляремии *Francisella tularensis*. / Н.Г. Олсуфьев, И.С. Мещерякова // Журнал гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии. – 1982. –№ 26. – С. 291-299.
- 42 Олсуфьев, Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. / Н.Г. Олсуфьев – М.: Медицина, 1975. – 192 с.
- 43 Олсуфьев, Н.Г. Туляремия. / Н.Г. Олсуфьев, Г.П. Руднев – М.: Медгиз, 1960. – 459 с.
- 44 Оноприенко, Н.Н. Сравнительная характеристика липополисахаридов

- бактерий рода *Francisella*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Н.Н. Оноприенко. – Ростов-на-Дону, 2001. – 23 с.
- 45 Оноприенко, Н.Н. Роль различных антигенных препаратов *Francisella tularensis* в формировании реакции аллергии у человека и животных / Н.Н. Оноприенко, Н.В. Аронова, Н.В. Павлович // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016 – № 1. – С. 22-29.
- 46 Осина, Н.А. Идентификация подвидов туляремийного микроба методом мультиплексной полимеразной цепной реакции / Н.А. Осина // Проблемы особо опасных инфекций. – 2007. – № 1 – С. 92-93.
- 47 Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. – М., Наука, 1981. – 288 с.
- 48 Павлович, Н.В. Устойчивость *Francisella tularensis* к бактерицидному действию нормальной сыворотки как критерий оценки вирулентности бактерий / Н.В. Павлович, В.М. Сорокин, Н.С. Благородова // Журнал микробиологии – 1996. – № 1. – С. 7-10.
- 49 Приказ Минздрав соцразвития РФ от 23.08.2010 №708н "Об утверждении Правил лабораторной практики" (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 №18713) 2010. – 22 с.
- 50 Родионова, И.В. Антигенный состав белков наружной мембраны туляремийного микроба. / И.В. Родионова, В.И. Захаренко // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1990. – № 11 – С. 16-18.
- 51 Родионова, И.В. Наружные мембраны туляремийного микроба и их белковый состав /И.В. Родионова, Н.Д. Константинова, Г.В. Бруханский // Молекулярная генетика. – 1989. – №12 – С. 22-25.
- 52 Родионова, И.В. Сравнительный анализ белковых антигенов *Francisella* / И.В. Родионова, И.С. Мещерякова, М.И. Кормилицына // Молекулярная

- генетика. – 1997. – №3. – С. 11-15.
- 53 Романова, Л.В. *Francisella tularensis*: некоторые аспекты экологии и диагностики: автореф. ... дис. докт. биол. Наук / Л.В. Романова. – Ставрополь, 2008. – 36 с.
- 54 Романова, Л.В. Стрессовый белок Gro El *Francisella tularensis*. / Л.В. Романова. С.О. Водопьянов, С.Р. Саямов, Б.Н. Мишанькин // Материалы научно-практической конференции, посвященные 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997г.). – Саратов, 1997. – Т. 2. – С. 14
- 55 Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных –National Acad. Press Washington, D.C. – 1996. – 138 p.
- 56 Салтыков, Р.А. Стабилизация иммуногенных свойств вакцинных штаммов бактерий. / Р.А. Салтыков // Журнал микробиологии. – 1976. – № 8. – С. 3-9.
- 57 Скатов, Д.В. Влияние антигенных фракций внешней мембраны *Francisella tularensis* на функциональную активность макрофагов / Д.В. Скатов, В.С. Хлебников, Р.Н. Василенко // Журнал микробиологии. – 1993. – № 4. – С. 87-91.
- 58 Сорокин, В.М. Роль поверхностных структур в проявлении вирулентности *Francisella tularensis*. / В.М. Сорокин, Н.В. Павлович, Л.А. Прозорова // Генетика и биохимия вирулентности возбудителя особо опасных инфекций: Тезисы докладов Российской научной конференции (21-22 октября 1992 г.). – Волгоград, 1992. – С. 130
- 59 Сорокин, В.М. Структура и функции липополисахарида *Francisella tularensis* / В.М. Сорокин, Л.А. Прозорова, Н.В. Павлович // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997г.). – Саратов– 1997. – Т. 2. – С. 124.
- 60 Сотников, Д. В. Определение специфических антител методом

- иммунохроматографии: количественные закономерности и практические приложения: диссертация ... кандидата химических наук: 03.01.04 / Д. В. Сотников. // Москва. – 2016. – 24 с.
- 61 Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности: Санитарные правила П 1.3.1285-03: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 15.04.2003. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2003. - 23 с.
- 62 Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности: Санитарные правила П 1.3.2322-08: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 15.04.2008. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. - 45 с.
- 63 Сухарь, В.В. Химическая и биологическая характеристика антигенов туляремийного микроба: автореф. ... дис. канд. мед. наук: 03.00.04 / В.В. Сухарь. – Ростов-на-Дону, 1988. – 24 с.
- 64 Сырова, Н.А. Современное состояние иммунодиагностики туляремии / Н.А. Сырова, Н.Е. Терешкина, З.Л. Девдариани. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2008. – Т. 97. – С 2-15.
- 66 Умнова, Н.С. Разработка иммуноферментных тест-систем для диагностики туляремии и бруцеллеза. / Н.С. Умнова// автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. – М., 1988. – 22 с.
- 67 Хатеневер, Л.М. Серологическая характеристика материала туляремического очага и получение агглютинирующих F. tularesnsis сывороток / Л.М. Хатеневер, М.Ю. Грунтфест // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1934. – № 2. – С. 76-80.
- 68 Хлебников, В.С. Изучение биохимических, антигенных и протективных свойств внешней мембраны возбудителя туляремии. / В.С. Хлебников, И.Р. Головлев, Д.П. Кулевацкий // Молекулярная генетика. – 1991. – № 7. – С. 15-20.
- 69 Хлебников, В.С. Иммунологическая эффективность внешних мембран

- Francisella tularensis* для обезьян-гамадрил / В.С. Хлебников, И.Р. Головлев, В.Е. Жемчугов // Журнал микробиология. – 1994. – № 3. – С. 61-63.
- 70 Хлебников, В.С. Определение антигенной детерминанты превентивных моноклональных антител, специфичных к липополисахариду *Francisella tularensis* / В.С. Хлебников, И.Р. Головлев, Н.В. Тохтамышева // Журнал микробиология. – 1993. – № 1. – С. 83-88.
- 71 Хлебников, В.С. Исследование ЛПС-белкового комплекса из внешней мембраны *Francisella tularensis*. / В.С. Хлебников, Д.П. Кулевацкий, И.Р. Головлев и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1992. – № 3. – С. 13-17.
- 72 Шамардин, В.А. Способ получения эритроцитарного диагностикума / В.А. Шамардин, Б.В. Каральник // АС СССР, № 634749 от 11.07.77 – 1978. – № 44.
- 73 Шмутер, М.Ф. Эффективность использования туляреминого антительного эритроцитарного диагностикума для выявления специфического антигена и антител к нему. / М.Ф. Шмутер, М.А. Айкимбаев, А.М. Елюбаева, Д.И. Брикман, Е.Ф. Чарная // Журнал микробиология. – 1978. – № 2. – С. 1-4.
- 74 Юров, С.В. Использование микроточечного иммуноферментного анализа с визуальной индикацией для определения туляреминых антител/ С.В. Юров, С.Ю. Пчелинцев, С.С. Афанасьев, А.А. Воробьев, Н.Н. Ураков, Г.В. Черенкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1991. – № 3. – С. 61-4.
- 75 Ancuta, P. Inability of the *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to mimic or to antagonize the induction of cell activation by endotoxins. / P. Ancuta, T. Pedron, R. Girard, G. Sandström, R. Chaby // Infection and Immunity. – 1996. – V. 64. – P. 2041-2046.
- 76 Anthony, L.S. Transformation and allelic replacement in *Francisella* spp./

- L.S. Anthony, M.Z. Gu, S.C. Cowley, W.W. Leung, F.E. Nano // J. Gen. Microbiology. – 1991. – V. 137. – P. 2697-2703.
- 77 Apicella, M.A. Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*. / M.A. Apicella, D.M. Post, A.C. Fowler, B.D. Jones, J.A. Rasmussen, J.R. Hunt, et al. // PLoS ONE – 2010. – V. 5. – P. e11060. doi:10.1371/journal.pone.0011060
- 78 Banada, P. Sensitive Detection of *Francisella tularensis* Directly from Whole Blood by Use of the GeneXpert System. / P. Banada, S. Deshpande, S. Chakravorty, et al. K.C. Carroll, ed. // Journal of Clinical Microbiology. – 2017. – V. 55. – P. 29 - 301. - doi:10.1128/JCM.01126-16.
- 79 Barker, J.H. Evidence Suggesting That *Francisella tularensis* O-Antigen Capsule Contains a Lipid A-Like Molecule That Is Structurally Distinct from the More Abundant Free Lipid A / J.H. Barker, J.W. Kaufman, M.A. Apicella, J.P. Weiss // PLoS ONE – 2016. – V. 11. – P. e0157842.- doi:10.1371/journal.pone.0157842.
- 80 Barut, S. A tularemia outbreak in an extended family in Tokat Province, Turkey: observing the attack rate of tularemia. / S. Barut, I. Cetin // International Journal of Infectious Diseases. – 2009. – V. 13. – P. 745-748. 10.1016/j.ijid.2008.12.002.
- 81 Beasley, A.S., A Variety of lipid a structures obtained from *Francisella tularensis*. LVS. / A.S. Beasley, R.J. Cotter, S.N. Vogel, T.J. Inzana, A.A. Qureshi, N. Qureshi // Innate immunity. – 2012. – V. 818. – P. 268-278. doi:10.1177/1753425911401054.
- 82 Behan, K.A. Reduction of *Brucella* species and *Francisella tularensis* cross-reacting agglutinins by dithiothreitol. / K.A. Behan, G.C. Klein // Journal of Clinical Microbiology. – 1982. – V. 16. – P. 756-757.
- 83 Bevanger, L. Agglutinins and antibodies to *Francisella tularensis* outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of tularemia / L. Bevanger, J.A. Maeland, A.I. Naess // Journal of Clinical

- Microbiology. – 1988. – V. 26. – P. 433-437.
- 84 Bevanger, L. Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later / L. Bevanger, J.A. Maeland, A.I. Kvan // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 1994. – V. 1. – P. 238-240.
- 85 Birdsell, D.N. *Francisella tularensis* subsp. *novicida* isolated from a human in Arizona. / D.N. Birdsell, T. Stewart, A.J. Vogler, E. Lawaczeck, A. Diggs, T.L. Sylvester, J.L. Buchhagen, R.K. Auerbach, P. Keim, and D.M. Wagner. // BMC Res. Notes. – 2009. – V. 2. – P. 223.
- 86 Bligh, E. A rapid method of total lipid extraction and purification. / E. Bligh, W. Dyer W. // Canadian Journal of Biochemistry. – 1959. – V. 37. – P. 911-23.
- 87 Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgramm quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford. // Analytical Biochemistry. – 1976. – V. 72. – P. 248-254
- 88 Brenner, D.J. Bergey's Manual of systematic bacteriology: volume two: the Proteobacteria, part A introductory essays. / D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity (eds), Boston.: Springer – 2005. – 304 p.
- 89 Brett, M. *Francisella novicida* Bacteremia after a Near-Drowning Accident. / M. Brett, A. Doppalapudi, L.B. Respicio-Kingry, et al. // Journal of Clinical Microbiology. – 2012. – V. 50. – P. 2826-2829. doi:10.1128/JCM.00995-12.
- 90 Brown, S.L. Evaluation of a safranin-O-stained antigen microagglutination test for francisella tularensis antibodies. / S.L. Brown, F.T. McKinney, G.C. Klein, W.L. Jones // Journal of Clinical Microbiology. – 1980 – V. 11 – P. 146-148.
- 91 Buchanan, T.M. The tularemia skin test. 325 skin tests in 210 persons: serologic correlation and review of the literature. / T.M. Buchanan, G.F. Brooks, and P.S. Brachman. // Journal of Clinical Microbiology. – 1971.

- V. 74. – P. 336-343.
- 92 Carlsson, H.E. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia. / H.E. Carlsson, A.A. Lindberg, G. Lindberg, B. Hederstedt, K.A. Karlsson, and B.O. Agell. // Journal of Clinical Microbiology. – 1979. – V. 10. – P. 615-621.
- 93 Celebi, B. Development of a novel *Francisella tularensis* antigen stained with tetrazolium-blue for tularemia microagglutination test. / B Celebi, S Kılıç // Mikrobiyoloji Bulteni. – 2013. – V. 47. – P. 514-22.
- 94 Celebi, G. Tularemia, a reemerging disease in northwest Turkey: epidemiological investigation and evaluation of treatment responses. / G. Celebi, F. Baruonu, F. Ayoglu, F. Cinar, A. Karadenizli, M.B. Ugur, et al. // Japanese journal of infectious diseases. – 2006. – V. 59. – P. 229-234.
- 95 Chaignat, V. Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. / V. Chaignat, M. Djordjevic-Spasic, A. Ruettger, P. Otto, D. Klimpel, W. Müller, ... H. Tomaso. // BMC Infectious Diseases. – 2014. – V. 14. – P. 234. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-14-234>
- 96 Chandler, J.C. *Francisella tularensis* LVS Surface and Membrane Proteins as Targets of Effective Post-Exposure Immunization for Tularemia. / J.C. Chandler, M.D. Sutherland, M.R. Harton, et al. // Journal of Proteome Research. – 2015. – V. 14. – P. 664-675. doi:10.1021/pr500628k.
- 97 Chapin, C.W. Review of our knowledge of bacterium TULARENSE. / CW. Chapin // American Journal of Public Health (New York, NY : 1912). – 1921. – V. 11. – P. 529-532.
- 98 Chen, W. Tularemia in BALB/c and C57BL/6 mice vaccinated with *Francisella tularensis* LVS and challenged intradermally, or by aerosol with virulent isolates of the pathogen: protection varies depending on pathogen virulence, route of exposure, and host genetic background. / W. Chen, H. Shen, A. Webb, R. KuoLee, J. W. Conlan. // Vaccine. – 2003. – V. 21. – P. 3690-3700

- 99 Christenson, B. An outbreak of tularemia in the northern part of central Sweden. / B. Christenson. // Scandinavian Journal of Infectious Diseases. – 1984. – V. 16. – P. 285–90. 10.3109/00365548409070402
- 100 Clarridge, J.E. Characterization of two unusual clinically significant *Francisella* strains. / J.E. Clarridge, T.J. Raich, A. Sjösted, G. Sandström, R.O. Darouiche, R.M. Shawar, P.R. Georghiou, C. Oosting, and L. Vo. // Journal of Clinical Microbiology. – 1996. – V. 34. – P. 1995-2000.
- 101 Colquhoun, D.J. Francisella infections in farmed and wild aquatic organisms / D.J. Colquhoun and S. Duodu // Veterinary Research. – 2011. – V. 8. – P. 42-47.
- 102 Conlan, J.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 alphabeta T cell- and interferon gamma-dependent mechanism. / J.W. Conlan, H. Shen, R. Kuolee, X. Zhao, and W. Chen, // Vaccine. – 2011. – V. 8. – P. 2477-2485
- 103 Conlan, J.W. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes / J.W. Conlan, R.J. North // Infection and Immunity. – 1992. – V. 60. – P. 5164-5171.
- 104 Conlan, J.W. Mice vaccinated with the O-antigen of *Francisella tularensis* LVS lipopolysaccharide conjugated to bovine serum albumin develop varying degrees of protective immunity against systemic or aerosol challenge with virulent type A and type B strains of the pathogen. / J.W. Conlan, H. Shen, A. Webb, M.B. Perry. // Vaccine. – 2002. – V. 20. – P. 3465-3471.
- 105 Conlan, J.W. Vaccines against *Francisella tularensis* - past, present, future. / J.W. Conlan. // Expert Review of Vaccines. – 2004. – V. 3. – P. 307-314.
- 106 Conlan, J.W. Vaccines against *Francisella tularensis*. / J.W. Conlan,

- P.C. Oyston // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2007. – V. 1105. – P. 325-350.
- 107 Cowley, S.C. Immunity to *Francisella*. / S.C. Cowley, K.L. Elkins // *Frontiers in microbial*. – 2011. – V. 2. – P. 1-20
- 108 Dahlstrand, S. Airborne tularemia in Sweden. / S. Dahlstrand, O. Ringertz, B. Zetterberg // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. – 1971. – V. 3. – P. 7-16
- 109 Dennis, D.T., Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. / D.T. Dennis, T.V. Inglesby, D.A. Henderson // *Journal of the American Medical Association*. – 2001. – V. 285. – P. 2763-2773
- 110 Drabick J.J. Passive protection of mice against lethal *Francisella tularensis* (live tularemia vaccine strain) infection by the sera of human recipients of the live tularemia vaccine / J.J. Drabick, R.B. Narayanan, J.C. Williams et al. // *The American Journal of the Medical Sciences*. – 1994. – V. 308. – P. 83-87
- 111 Eigelsbach, H.T. Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig. / H.T. Eigelsbach, C.M. Downs. // *Journal of Immunology*. – 1961. – V. 87. – P.415-425.
- 112 Eliasson, H. Clinical use of a diagnostic PCR for *Francisella tularensis* in patients with suspected ulceroglandular tularaemia. / H. Eliasson, A. Sjöstedt, and E. Bäck. // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. – 2005. – V. 37. – P. 833-837.
- 113 Eliasson, H. Kinetics of the Immune Response Associated with Tularemia: Comparison of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, a Tube Agglutination Test, and a Novel Whole-Blood Lymphocyte Stimulation Test / H. Eliasson, P. Olcén, A. Sjöstedt, M. Jurstrand, E. Bäck, S. Andersson // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2008. – V. 15. – P. 1238-1243
- 114 Eliasson, H. The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. / H. Eliasson, J. Lindbäck,

- J.P. Nuorti, et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2002. – V. 8. – P. 956-960. 10.3201/eid0809.020051
- 115 Elkins, K.L. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria / K.L. Elkins, T.R. Rhinehart- Jones, S. Stibitz et al. // *Journal of Immunology*. – 1999. – V. 162. – P. 2291-2298.
- 116 Elkins, K.L. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain / K.L. Elkins, C.M. Bosio, T.R. Rhinehart-Jones. // *Infection and Immunity*. – 1999. – V. 67. – P. 6002-6007.
- 117 Ellis, J. Tularemia. / J. Ellis, C.F. Oyston, M. Green, R.W. Titball // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2002. – V. 15. – P. 631-646.
- 118 Eneslätt, K. Persistence of cell-mediated immunity three decades after vaccination with the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. / K. Eneslätt, C. Rietz, P. Rydén, S. Stöven, R.V. House, L.A. Wolfraim, A. Tärnvik, A. Sjöstedt // *European Journal of Immunology*. – 2011. – V. 41. – P. 974-980.
- 119 Eneslätt, K. Signatures of T cells as correlates of immunity to *Francisella tularensis*. / K. Eneslätt, M. Normark, R. Björk, C. Rietz, C. Zingmark, L.A. Wolfraim et al. // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – P. e32367.
- 120 Ericsson, M. Long-lasting recall response of CD4+ and CD8+ alphabeta T cells, but not gammadelta T cells, to heat shock proteins of *Francisella tularensis*. / M Ericsson, M Kroca, T Johansson // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. – 2001. – V. 33(2). – P. 145-152.
- 121 Ericsson, M. Persistence of cell mediated immunity and decline of humoral immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* 25 years after natural infection. / M. Ericsson, G. Sandstrom, A. Sjostedt, et al // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1994. – V. 70. – P. 110-114.
- 122 Eyles, J.E. Immunodominant *Francisella tularensis* antigens identified using

- proteome microarray. Crown Copyright 2007 / J.E. Eyles, B. Unal, M.G. Hartley // *Journal of Proteomics*. – 2007. – V. 7. – P. 2172-2183.
- 123 Fortier, A.H. Life and death of an intracellular pathogen: *Francisella tularensis* and the macrophage. Review / A.H. Fortier, S.J. Green, T. Polsinelli // *Journal of Immunology*. – 1994. – V. 60. – P. 349-361.
- 124 Foshay, L. Tularemia. Accurate and earlier diagnosis by means of the intradermal reaction. / L. Foshay. // *Journal of Infectious Diseases*. – 1931. – V. 51. – P. 286-291.
- 125 Francis, E. A summary of present knowledge of Tularaemia. / E. Francis // *Medicine*. – 1928. – V. 7. – P. 411-432.
- 126 Friis-Møller, A. Problems in Identification of *Francisella philomiragia* Associated with Fatal Bacteremia in a Patient with Chronic Granulomatous Disease. / A. Friis-Møller, L.E. Lemming, N.H. Valerius, B. Bruun // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – V. 42. – P. 1840-1842. doi:10.1128/JCM.42.4.1840-1842.2004.
- 127 Fulop M. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of *Francisella tularensis* / M. Fulop, P. Mastroeni, M. Green, R.W. Titball // *Vaccine*. – 2001. – V. 19. – P. 4465-4472
- 128 Fulop M. Role of two outer membrane antigens in the induction of protective immunity against *F. tularensis* strains of different virulence / M. Fulop, R. Manchee, R. Titball // *Fems Immunology*. – 1996. – V. 13. – P. 245-247
- 129 Fulop M. Use of a zwitterionic detergent for the restoration of the antibody binding capacity of immunoblotted *Francisella tularensis* lipopolysaccharide / M. Fulop, T. Webber, R. Manchee // *Analytical Biochemistry*. – 1992. – V. 203. – P. 141-145.
- 130 Fulop, M. Activation of the complement system by *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. / M. Fulop, T. Webber, R. Manchee. // *Microbiologica*. – 1993. – V. 16. – P. 141-148.
- 131 Fulop, M. Production and characterization of monoclonal antibodies directed

- against the lipopolysaccharide of *Francisella tularensis*. / M. Fulop, T. Webber, R. Manchee. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1991. – V. 29. – P. 1407-1412.
- 132 Fulop, M. Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from *Francisella tularensis* in the induction of immunity against tularemia. / M. Fulop, R. Manchee, R. Titball, et al // *Vaccine*. – 1995. – V. 13. – P. 1220-1225.
- 133 Fulton, K.M. Immunoproteomic analysis of the human antibody response to natural tularemia infection with Type A or Type B strains or LVS vaccination. / K.M. Fulton, X. Zhao, M.D. Petit, S.L. Kilmury, L.A. Wolfrain, R.V. House, et al. // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2011. – V. 301. – P. 591-601. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.07.002.
- 134 Gürcan Ş. Epidemiology of Tularemia. / Ş Gürcan.// *Balkan medical journal*. – 2014. – V. 31. – P. 3-10. doi:10.5152/balkanmedj.2014.13117.
- 135 Galanos, C. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides / C. Galanos, O. Luderitz, O. Westphal // *European Journal Of Biochemistry*. – 1969. – V. 9. – P. 245-249.
- 136 Gelman, A.C. The ecology of tularemia / A.C. Gelman, J.M. May editor // *In Studies in Disease Ecology*. – 1961. – P. 89-108.
- 137 Geyer, S.J. Tularemia. / S.J. Geyer, A. Burkey, F.W. Chandler // In: Connor DH. *Pathology of Infectious Diseases*. Stamford, CT: Appleton & Lange. – 1997. –P. 869-73
- 138 Golovliov, I. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. / I. Golovliov, V. Baranov, Z. Krocova, H. Kovarova, A. Sjostedt. // *Infection and Immunity*. – 2003. – V. 71. – P. 5940-5950.
- 139 Golovliov, I. An In Vitro Co-culture Mouse Model Demonstrates Efficient Vaccine-Mediated Control of *Francisella tularensis* SCHU S4 and Identifies

- Nitric Oxide as a Predictor of Efficacy. // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2016. – V. 152. – P. doi:10.3389/fcimb.2016.00152.
- 140 Golovliov, I. Cytokine expression in the liver during the early phase of murine tularemia / I. Golovliov, G. Sandstrom, M. Ericsson. // *Infection and Immunity*. – 1995. – V. 63. – P. 534-538.
- 141 Golovliov, I. Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. / I. Golovliov, M. Ericsson, G. Sandstrom et al. // *Infection and Immunity*. – 1997. – V. 65. – P. 2183-2189
- 142 Greco, D. A waterborne tularemia outbreak. / D. Greco, G. Allegrini, T. Tizzi, E. Ninu, A. Lamanna, S. Luzi. // *European Journal of Epidemiology*– 1987. – V. 3. – P. 35-8
- 143 Green, M. Efficacy of the live attenuated *Francisella tularensis* vaccine (LVS) in a murine model of disease. / M. Green, G. Choules, D. Rogers, et al // *Vaccine*. – 2005. – V. 23. – P. 2680-2686.
- 144 Grunow R. A procedure for differentiating between the intentional release of biological warfare agents and natural outbreaks of disease: its use in analyzing the tularemia outbreak in Kosovo in 1999 and 2000 / R. Grunow, E.J. Finke // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2002. – V. 8. – P. 510-521.
- 145 Gunn, J.S. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide. / J.S. Gunn, R.K. Ernst // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2007. – V. 1105. – P. 202-218.
- 146 Gurcan, S. Tularemia re-emerging in European part of Turkey after 60 years. / S. Gurcan, M. Eskiocak, G. Varol, C. Uzun, M. Tatman-Otkun, N. Sakru, et al. // *Japanese journal of infectious diseases*. – 2006. – V. 59. – P. 391–393
- 147 Gurycova, D. Epidemiologic characteristics of tularemia in Slovakia. / D. Gurycova. // *Bratisl Lek Listy* – 2006. – V. 107. – P. 224.

- 148 Gyuranecz, M. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. / M. Gyuranecz, D.N. Birdsell, W. Splettstoesser, et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2012. – V. 18. – P. 290-293. doi:10.3201/eid1802.111305.
- 149 Hajjar, A.M. Lack of in vitro and in vivo recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors. / A.M. Hajjar, M.D. Harvey, S.A. Shaffer, D.R. Goodlett, A. Sjostedt, H. Edebro et al. // *Infection and Immunity*. – 2006. – V. 74. – P. 6730-6738
- 150 Hartley, G. Grey variants of the live vaccine strain of *Francisella tularensis* lack lipopolysaccharide O-antigen, show reduced ability to survive in macrophages and do not induce protective immunity in mice. / G. Hartley, R. Taylor, J. Prior, S. Newstead, P.G. Hitchen, H.R. Morris, A. Dell, R.W. Titball. // *Vaccine* – 2006. – V. 24. – P. 989-996. 10.1016/j.vaccine.2005.08.075
- 151 Hartley, M.G. GroEL as a subunit vaccine candidate for *Francisella tularensis* infection in mice. / M.G. Hartley, M. Green, G. Choules et al.// *Abstr. the 3rd Int. Conf. on Tularemia*. - Sweden, Umea. – 2000. – P. 51
- 152 Havlasova, J. Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain. / J. Havlasova, L Hernychova, P. Halada, V. Pellantova, J. Krejsek, et al. // *Proteomics*. – 2002. – V. 2. – P. 857-867.
- 153 Havlasova, J., Proteomic analysis of anti-*Francisella tularensis* LVS antibody response in murine model of tularemia. / J. Havlasova, M. Hernychova, M. Brychta // *Proteomics*. – 2005. – V. 5. – P. 2090-2103.
- 154 Henderson, J.C. Isolation and Chemical Characterization of Lipid A From the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. / J.C. Henderson, J.P. O'Brien, J.S. Brodbelt, M.S. Trent. // *Journal of visualized experiments : JoVE*. – 2013. – V. 79. – P. e50623. doi:10.3791/50623.
- 155 Hepburn, M.J. Tularemia: current diagnosis and treatment options. / M.J. Hepburn, A.J.H. Simpson // *Expert Review of Anti-infective Therapy* –

2008. – V. 6. – P. 231-240
- 156 Hepburn, M.J. Tularemia. / M.J. Hepburn, A.M. Friedlander, Z.F. Dembek // In: Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Biological Warfare. Washington, DC: Borden Institute, US Army. – 2008. –P. 167-84
- 157 Hitchcock, P.J. Preparation of proteinase K-treated cell lysates for SDS-PAGE / P.J. Hitchcock, T.M. Brown // Journal of Bacteriology. – 1983. – V. 154. – P. 269-277
- 158 Hollis, D.G. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. / D.G. Hollis, R.E. Weaver, A.G. Steigerwalt, J.D. Wenger, C.W. Moss, D.J. Brenner. // Journal of Clinical Microbiology. – 1989. – V. 27. – P. 601-1608.
- 159 Hopla, C.E. The ecology of tularemia. / C.E. Hopla.// Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. – 1974. – V. 18. – P. 25-53
- 160 Hubalek, M. Comparative proteome analysis of cellular proteins extracted from highly virulent *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* and less virulent *F. tularensis* ssp. *holarctica* and *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica*. / M. Hubalek, L. Hernychova, M. Brychta, J. Lenco, J. Zechovska, and J. Stulik. // Proteomics – 2004. – V. 4. – P. 3048-3060.
- 161 Huber B. Description of *Francisella hispaniense* sp. nov., isolated from human blood, re-classification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella* / B. Huber, R. Escudero, H.J. Busse et al // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2010. – V. 60.– P. 1887-1896
- 162 Huntley, J.F. Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. / J.F. Huntley, P.G. Conley, K.E. Hagman, M.V. Norgard // J. Bacteriology. – 2007. – V. 189. – P. 561-574. 10.1128/JB.01505-06
- 163 Issekutz A.C. Removal of gram-negative endotoxin from solutions by affinity

- chromatography / A.C. Issekutz // Journal of Immunological Methods. – 1983. – V. 61. – P. 275-282.
- 164 Janovska, S. Identification of immunoreactive antigens in membrane proteins enriched fraction from *Francisella tularensis* LVS. / S. Janovska, I. Pavkova, M. Hubalek, J. Lenco, A. Macela, J. Stulik. // Immunology Letters. – 2007a. – V. 52. – P. 151-159. 10.1016/j.imlet.2006.12.004
- 165 Janovska, S. Proteomic analysis of antibody response in a case of laboratory-acquired infection with *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. / S. Janovska, I. Pavkova, M. Reichelova, M. Hubaleka, J. Stulik, A. Macela. // Folia Microbiology (Praha). – 2007b. – V. 52. – P. 194-198. 10.1016/j.imlet.2006.12.004
- 166 Johansson, A. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. / A. Johansson, L. Berglund, U. Eriksson, I. Goransson, R. Wollin, M. Forsman, A. Tarnvik, and A. Sjostedt. // Journal of Clinical Microbiology. – 2000. – V. 38. – P. 22-26
- 167 Johansson, A. Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis*. / A. Johansson, J. Celli, W. Conlan, K.L. Elkins, M. Forsman, P.S. Keim, P. Larsson, C. Manoil, F.E. Nano, J.M. Petersen, A. Sjöstedt. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2010. – V. 60. – P. 1717–1718; author reply 1718–1720
- 168 Kanistanon, D. A *Francisella* Mutant in Lipid A Carbohydrate Modification Elicits Protective Immunity. / D. Kanistanon, A.M. Hajjar, M.R. Pelletier, L.A. Gallagher, T. Kalhorn, S.A. Shaffer et al. // PLoS Pathog. – 2008. – V. 4. – P. e24 doi: 10.1371/journal.ppat.0040024.
- 169 Kantardjiev, T. Tularemia outbreak, Bulgaria, 1997-2005. / T. Kantardjiev, I. Ivanov, T. Velinov, P. Padeshki, B. Popov, R. Nenova, et al. // Emerging Infectious Diseases. – 2006. – V. 12. – P. 678-680. 10.3201/eid1204.050709.
- 170 Karagöz, S. *Francisella tularensis* bacteremia: report of two cases and review

- of the literature. / S. Karagöz, S. Kiliç, E. Berk, A. Uzel, B. Çelebi, Ş. Çomoğlu, A. Karagöz, I. Akyar, S.Can // *New Microbiol* – 2013. – V. 36 – P. 315-323.
- 171 Karttunen, R. Interleukin 2 and gamma interferon production, interleukin 2 receptor expression, and DNA synthesis induced by tularemia antigen in vitro after natural infection or vaccination. / R. Karttunen, G. Andersson, H.P. Ekre, K. Juutinen, H.M. Surcel, H. Syrjälä, E. Herva // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1987. – V. 25. – P. 1074-1078.
- 172 Karttunen, R. Interleukin 2 production in whole blood culture: a rapid test of immunity to *Francisella tularensis*. / R. Karttunen, J. Ilonen, and E. Herva. // *Clinical Microbiology*. – 1985. – V. 22. – P. 318-319.
- 173 Kilmury, S.L.N. The *Francisella tularensis* proteome and its recognition by antibodies. / S.L.N. Kilmury, S.M. Twine // *Front Microbiology*. – 2010. – V. 1 – P. 143
- 174 Kingry, L.C. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. / L.C. Kingry, J.M. Petersen. // *Front Cell Infect Microbiology*. – 2014. – V. 4 – P. 35. 4:35. 10.3389/fcimb.2014.00035.
- 175 Koskela, P. Cell-mediated and humoral immunity induced by a live *Francisella tularensis* vaccine. / P. Koskela, , and E. Herva. 1982. // *Infection and Immunity*. – 1982. – V. 36. – P. 983-989.
- 176 Koskela, P. Cell-mediated immunity against *Francisella tularensis* after natural infection / P. Koskela, E. Herva // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. – 1980. – V. 12. –P. 281-287/
- 177 Koskela, P. Humoral immunity against *Francisella tularensis* after natural infection/ P. Koskela // *Clinical Microbiology*. – 1985. – V. 22. – P. 973-979.
- 178 Koskela, P. Cell-mediated and humoral immunity induced by a live *Francisella tularensis* vaccine. / P. Koskela, and E. Herva. 1982. // *Infection and Immunity*. – 1982. – V. 36. – P. 983-989.
- 179 Kugeler, K.J. Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B. /

- K.J. Kugeler, R. Pappert, Y. Zhou, and J.M. Petersen. // *Infection and Immunity*. – 2006. – V. 12. – P. 1799-1801.
- 180 Koskela, P. Cell-mediated immunity against *Francisella tularensis* after natural infection / P. Koskela, E. Herva // *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. – 1980. – V. 12. – P. 281-287/
- 181 Lee, K.R. Mouse model of oral infection with virulent type A *Francisella tularensis*. / K.R. Lee, X. Zhao, J. Austin, G. Harris, J.W. Conlan, W. Chen // *Infection and Immunity*. – 2007. – V. 75. – P. 1651-1660.
- 182 Leelaporn, A. *Francisella novicida* bacteremia, Thailand. / A. Leelaporn, S. Yongyod, S. Limsrivanichakorn, T. Yungyuen, P. Kiratisin // *Emerging Infectious Diseases*. – 2008. – V. 14. – P. 1935-1937.
- 183 Li, J. Attenuation and protective efficacy of an O-antigen-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS. / J. Li, C. Ryder, M. Mandal, F. Ahmed, P. Azadi, D.S. Snyder, R.D. Pechous, T. Zahrt, T.J. Inzana. // *Microbiology*. – 2007. – V. 153. – P. 3141-3153.
- 184 Ljung, O. 1957. Clinical use of the intracutaneous test in tularemia. / O. Ljung. // *Sven Lakartidn*. – 1957. – V. 54. – P. 2223-2227.
- 185 Ljung, O. Intradermal and agglutination tests in tularaemia; with particular regard to the demonstration of past infection. / O. Ljung. // *Acta Med. Scand*. – 1958. – V. 160. – P. 149-154.
- 186 Lowry, O.H. Protein measurement with the folin phenol / O.H. Lowry, N.R. Rosenbrough, A.L. Farr et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – V. 193. – P. 115-119.
- 187 Mörner, T. The ecology of tularaemia. / T. Mörner, // *Rev. Sci. Tech*. – 1992. – V. 11 – P. 1123-1130.
- 188 Massey, E.D. Microagglutination Test for Detecting and Measuring Serum Agglutinins of *Francisella tularensis*. / E.D. Massey, J.A. Mangiafico // *Applied Microbiology*. – 1974. – V. 27 – P. 25-27.
- 189 Matz-Rensing, K. Epizootic of tularemia in an out door housed group of

- cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). / K. Matz-Rensing, A. Floto, A. Schrod, T. Becker, E.J. Finke, E. Seibold, et al. // *Veterinary pathology*. – 2007. – V. 44. – P. 327-34. doi: 10.1354/vp.44-3-327.
- 190 Maurin, M. *Francisella tularensis* as a potential agent of bioterrorism? *Expert Rev / M. Maurin // Anti-infective Therapy*. – 2015. – V. 13 – P. 141-144.
- 191 Mayer H. Analysis of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. / H. Mayer, R.N. Tharanathan, J. Weckesser. // *Journal of Microbiological Methods*. - London. – 1985. – V. 18. – P. 157-207.
- 192 McLendon, M.K. Identification of LpxL, a late acyltransferase of *Francisella tularensis*. / M.K. McLendon, B. Schilling, J.R. Hunt, M.A. Apicella, B.W. Gibson. // *Infection and Immunity*. – 2007. – V. 75. – P. 5518-5531.
- 193 Mdluli, K.E. Serum-sensitive mutation of *Francisella novicida*: association with an ABC transporter gene. / K.E. Mdluli, L.S. Anthony, G.S. Baron, M.K. McDonald, S.V. Myltseva, F.E // *Nano Microbiology* – 1994. – V. 140. – P. 3309-3318.
- 194 Meckenstock, R. A case of tularemia after an endurance run in a non-endemic region. / R. Meckenstock, A. Therby, Le Monnier, A. Khau, D. Monnier, S. Pangon B. Greder-Belan. // *Infection*. – 2013. – V. 41. – P. 263-6. doi: 10.1007/s15010-012-0350-6.
- 195 Melillo, A.A. IL-12R β 2 is critical for survival of primary *Francisella tularensis* LVS infection. / A.A. Melillo, O. Foreman, K.L. Elkins // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2013. – V. 93. – P. 657-67.
- 196 Meric, M. Tularaemia outbreaks in Sakarya, Turkey: case-control and environmental studies. / M. Meric, M. Sayan, D. Dundar, A. Willke. // *Singapore Medical Journal*. – 2010. – V. 51. – P. 655-9.
- 197 Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*. N.Y. / J.H. Miller // Gold Spring Harbor Lab., Gold Spring Harbor, New York – 1972. – 344p.
- 198 Millington, K.A. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load. /

- K.A. Millington, J.A. Innes, S. Hackforth, T.S. Hinks, J.J. Deeks, et al. // *Journal of Immunology*. – 2007. – V. 178. – P. 5217-5226.
- 199 Mollaret, H. Report (1966-1970) of Subcommittee on Pasteurella, Yersinia and Francisella to the International Committee on nomenclature of bacteria / H. Mollaret, W. Knapp // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1971. – V. 21. – P. 157
- 200 Morrison, L.J. UVliPiD: A UVPD-based hierarchical approach for de novo characterization of lipid A structures. / LJ Morrison, Parker WR, Holden DD, et al. // *Analytical chemistry*. – 2016. – V. 88. – P. 1812-1820. doi:10.1021/acs.analchem.5b04098.
- 201 Nakajima, R. Towards Development of Improved Serodiagnostics for Tularemia by Use of Francisella tularensis Proteome Microarrays. / R. Nakajima, R. Escudero, D.M. Molina, et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2016. – V. 54. – P. 1755-1765. <http://doi.org/10.1128/JCM.02784-15>
- 202 Nakajima, R. Towards Development of Improved Serodiagnostics for Tularemia by Use of Francisella tularensis Proteome Microarrays. / R. Nakajima, R. Escudero, D.M. Molina, et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2016. – V. 54. – P. 1755-1765. <http://doi.org/10.1128/JCM.02784-155>
- 203 Nutter J.E. In vitro interactions between rabbit alveolar macrophages and Pasteurella tularensis / J.E. Nutter, Q.N. Myrvik // *Journal of Bacteriology*. – 1966. – V. 92. – P. 645-651
- 204 Okan, N.A. The atypical lipopolysaccharide of Francisella. / N.A. Okan, and D.L. Kasper. // *Carbohydr.Res.* – 2013. – V. 378. – P. 79-83. doi:10.1016/j.carres.2013.06.01
- 205 Oyston, P.C.F. Tularaemia: bioterrorism defense renews interest in Francisella tularensis. / P.C.F. Oyston, A. Sjostedt, R.W. Titball // *Nature Reviews Microbiology* – 2004. – V. 2. – P. 967-978.

- 206 Oyston, P.C. Francisella tularensis vaccines. / P.C. Oyston. // Vaccine – 2009. – V. 27. – P. 48-51. 10.1016/j.vaccine.2009.07.090
- 207 Oyston, P.C. Francisella tularensis: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. / P.C. Oyston. // Microbiology Society Journals. – 2008. – V. 57. – P. 921-930. 10.1099/jmm.0.2008/000653-0
- 208 Pérez-Castrillón, J.L. Tularemia epidemic in Northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. / J.L. Pérez-Castrillón, P. Bachiller-Luque, M. Martín-Luquero, F.J. Mena-Martín, V. Herreros // Clinical Infectious Diseases. – 2001. – V. 33. – P. 573-576. 10.1086/322601.
- 209 Pavkova, I. Francisella tularensis live vaccine strain: proteomic analysis of membrane proteins enriched fraction. / I. Pavkova, M. Hubalek, J. Zechovska, J. Lenco, J. Stulik // Proteomics – 2005. – V. 5. – P. 2460-2467. 10.1002/pmic.200401213.
- 210 Payne, L. Endemic tularemia, Sweden, 2003. / L. Payne, M. Arneborn, A. Tegnell, J. Giesecke // Emerging Infectious Diseases. – 2005. – V. 11. – P. 1440-1442. 10.3201/eid1109.041189.
- 211 Phillips, N.J. Novel modification of lipid A of Francisella tularensis. / N.J. Phillips, B. Schilling, M.K. McLendon, M.A. Apicella, B.W. Gibson // Infection and Immunity. – 2004. – V. 72. – P. 5340-5348.
- 212 Popov, Ch.S. Influence of the lipopolisaccharide from Francisella tularensis on the stability of liver lysosomes and peroxisomes / Popov Ch.S., D.G. Tsonchev, M.D. Mironova et al. // Докл. Бол. АН. – 1983. – V. 36. – P. 945-948.
- 213 Porsch-Ozcurumez, M. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. / M. Porsch-Ozcurumez, N. Kischel, H. Priebe, W. Splettstoesser, E.J. Finke, and R. Grunow. // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2004. – V. 11. – P. 1008-1115

- 214 Post, D.M.B. Characterization of Inner and Outer Membrane Proteins from *Francisella tularensis* Strains LVS and Schu S4 and Identification of Potential Subunit Vaccine Candidates. / D.M.B. Post, B. Slütter, B. Schilling, et al. Ruby EG, ed. // *mBio*. – 2017. – V. 8. – P. e01592-17. doi:10.1128/mBio.
- 215 Prior, J.L. Characterization of the O antigen gene cluster and structural analysis of the O antigen of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. / J.L. Prior, R.G. Prior, P.G. Hitchen, H. Diaper, K.F. Griffin, H.R. Morris, A. Dell, R.W. Titball. // *Journal of Medical Microbiology*. 10.1099/jmm.0.05184-0.
- 216 Raetz, C.R. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. / C.R. Raetz, Z. Guan, B.O. Ingram, D.A. Six, F. Song, X. Wang et al. // *Journal of Lipid Research*. – 2009. – V. 50. – P. 103-8. doi: 10.1194/jlr.R800060-JLR200.
- 217 Raetz, C.R. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. / C.R. Raetz, C.M. Reynolds, M.S. Trent, R.E. Bishop. // *Annual Review of Biochemistry*. – 2007. – V. 76. – P. 295-329.
- 218 Raetz, C.R. Lipopolysaccharide endotoxins. / C.R. Raetz, C. Whitfield // *Annual Review of Biochemistry*. – 2002. – V. 71. – P. 635-700.
- 219 Ransmeier, J.C. The agglutination reaction in tularemia. / J.C. Ransmeier, and C.L. Ewing. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1941. – V. 69. – P. 193-205.
- 220 Rastawicki, W. Development and evaluation of a latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of tularemia. / W. Rastawicki, N. Rokosz-Chudziak, A. Chróst, R. Gierczyński // *Microbiology Methods*. – 2015. – V. 112. – P. 1-2
- 221 Rawool, D.B. Utilization of Fc receptors as a mucosal vaccine strategy against an intracellular bacterium, *Francisella tularensis*. / D.B. Rawool, C. Bitsaktsis, Y. Li, D.R. Gosselin, Y. Lin, N.V. Kurkure, D.W. Metzger, and E.J. Gosselin. // *Journal of Immunology*. – 2008. – V. 180. – P. 5548-5557.

- 222 Reintjes, R. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. / R. Reintjes, I. Dedushaj, A. Gjini, T.R. Jorgensen, B. Cotter, A. Lieftucht, et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2002. – V. 8. – P. 69-73. 10.3201/eid0801.010131.
- 223 Roche, M.I. Characterization of Monoclonal Antibodies to Terminal and Internal O-Antigen Epitopes of *Francisella tularensis* Lipopolysaccharide. / M.I. Roche, Z. Lu, J.H. Hui, J. Sharon // *Hybridoma*. – 2011. – V. 30. – P. 19-28. doi:10.1089/hyb.2010.0083.
- 224 Rowe, H.M. From the Outside-In: The *Francisella tularensis* Envelope and Virulence. / H.M. Rowe, J.F. Huntley // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2015. – V. 5. – P. 94. doi:10.3389/fcimb.2015.00094.
- 225 Rynkiewicz, M.J. Structural Analysis of a Protective Epitope of the *Francisella tularensis* O-Polysaccharide. / M.J. Rynkiewicz, Z. Lu, J.H. Hui, J. Sharon, B.A. Seaton // *Biochemistry*. – 2012. – V. 51. – P. 5684-5694. doi:10.1021/bi201711m.
- 226 Sandström, G. Antigen from *Francisella tularensis*: nonidentity between determinants participating in cell-mediated and humoral reactions. / G. Sandström, A. Tärnvik, H. Wolf-Watz, and S. Löfgren. // *Infection and Immunity*. – 1984. – V. 45. – P. 101-106.
- 227 Sandstrom, G. A capsule-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. / G. Sandstrom, S. Lofgren, A. Tarnvik // *Infection and Immunity*. – 1988. – V. 56. – P. 1194-1202
- 228 Santiago, A.E. Characterization of *Francisella tularensis* Schu S4 defined mutants as live-attenuated vaccine candidates. / A.E. Santiago, B.J. Mann, A. Qin, et al. A.J. Forsberg, ed. // *Pathogens and Disease*. – 2015. – V. 73. – P. ftv036. doi:10.1093/femspd/ftv036.
- 229 Sara, L.N. The *Francisella tularensis* proteome and its recognition by antibodies. / L.N. Sara, K M. Twine, S.M. Twine. // *Front Microbiology*. –

2010. – V. 1 – doi: 10.3389/fmicb.2010.00143
- 230 Sarva, S.T. Comparative Transcriptional Analyses of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. / S.T. Sarva, R.H. Waldo, R.J. Belland, K.E. Klose C.S. Bakshi, ed. // PLoS ONE. – 2016. – V. 11. – P. e0158631. doi:10.1371/journal.pone.0158631.
- 231 Sasaki, J. Relationship between stainability and virulence of *F. tularensis* / J. Sasaki // North American Journal of Medical Sciences. – 1966. – V. 11. – P. 191-195.
- 232 Sato, T. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. / T. Sato, H. Fujita, Y. Ohara, M. Homma //Journal of Clinical Microbiology. – 1990. – V. 28. – P. 2372-2374.
- 233 Schmerk, C.L. Characterization of the pathogenicity island protein PdpA and its role in the virulence of *Francisella novicida*. / C.L. Schmerk, B.N. Duplantis, D. Wang, et al. // Microbiology. – 2009. – V. 155. – P. 1489-1497. doi:10.1099/mic.0.025379-0.
- 234 Schmitt, P. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. / P. Schmitt, W. Splettstoesser, M. Porsch-Ozcürümez, E.J. Finke, R. Grunow // Epidemiol Infection. – 2005. – V. 133. – P. 759-766.
- 235 Seder, R.A. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. / R.A. Seder, P.A. Darrah, M. Roederer. // Nature Reviews Immunology – 2008. – V. 8. – P. 247-258.
- 236 Shaffer, S.A. Structural heterogeneity and environmentally regulated remodeling of *Francisella tularensis* subspecies *novicida* lipid A characterized by tandem mass spectrometry. / S.A. Shaffer, M.D. Harvey, D.R. Goodlett, R.K. Ernst. // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 2007. – V. 18. – P. 1080-1092.
- 237 Shapiro, D.S. Exposure of laboratory workers to *Francisella tularensis* despite a bioterrorism procedure. / D.S. Shapiro, D.R. Schwartz // Clinical

- Microbiology. – 2002. – V. 40. – P. 2278-2281.
- 238 Sharma, J. Lethal pulmonary infection with *Francisella novicida* is associated with severe sepsis. / J. Sharma, Q. Li, B.B. Mishra, C. Pena, J.M. Teale // 1 Journal of Leukocyte Biology. – 2009. – V. 86. – P. 491-504.
- 239 Sharma, N. Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. / N. Sharma, A. Hotta, Y. Yamamoto, O. Fujita, A. Uda, S. Morikawa, A. Yamada, K. Tanabayashi // Clinical and Vaccine Immunology. – 2013. – V. 20. – P. 9-16
- 240 Shen, H. Molecular Immune Responses to Aerosol Challenge with *Francisella tularensis* in Mice Inoculated with Live Vaccine Candidates of Varying Efficacy. / H. Shen, G. Harris, W. Chen, A. Sjöstedt, P. Ryden, W. Conlan, S. Jeyaseelan, ed. // PLoS ONE. – 2010. – V. 5. – P. e13349. doi:10.1371/journal.pone.0013349.
- 241 Siret, V. An outbreak of airborne tularaemia in France, August 2004. / V. Siret, D. Barataud, M. Prat, V. Vaillant, S. Ansart, A. Le Coustumier, et al. // Euro Surveill. – 2006. – V. 11. – P. 58-60.
- 242 Sjöstedt, A. Molecular cloning and expression of a T - cell stimulating protein of *Francisella tularensis* / A. Sjöstedt, G. Sandström, A. Tärnvik, B. Jaurin // Microbial Pathogenesis. – 1989. – V. 6. – P. 403-414.
- 243 Sjöstedt, A. Various membrane proteins of *Francisella tularensis* induce interferon- γ production in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells of primed humans / A. Sjöstedt, M. Eriksson, G. Sandström, A. Tärnvik. // Immunology. – 1992. – V. 76. – P. 584-592.
- 244 Sjöstedt, A. Humoral and cell-mediated immunity in mice to a 17-kilodalton lipoprotein of *Francisella tularensis* expressed by *Salmonella typhimurium* / A. Sjöstedt, G. Sandström, A. Tärnvik // Infection and Immunity. – 1992. – V. 60. – P. 2855-2862.
- 245 Sjöstedt, A. Several membrane polypeptides of the live vaccine strain

- Francisella tularensis* LVS stimulate T-cell from naturally infected individuals / A. Sjostedt, G. Sandstrom, A. Tarnvik // *Clinical Microbiology*. – 1990. – V. 28. – P. 43-48.
- 246 Sjostedt, A. The T-cell-stimulating 17-kilodalton protein of *Francisella tularensis* LVS is a lipoprotein / A. Sjostedt, A. Tarnvik, G. Sandstrom // *Infection and Immunity*. – 1991. – V. 59. – P. 3163-3168.
- 247 Sjostedt, A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis* / A. Sjostedt // *Current Opinion In Microbiology*. – 2003. – V. 6. – P. 66-71
- 248 Skerman, V.B.D. Approved lists of bacterial names. / V.B.D. Skerman, V. McGowan, P.H.A. Sneath, (eds.). // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1980. – V. 30. – P. 225–420.
- 249 Soni, S. *Francisella tularensis* blue–gray phase variation involves structural modifications of lipopolysaccharide O-antigen, core and lipid A and affects intramacrophage survival and vaccine efficacy. / S. Soni, R.K. Ernst, A. Muszynski, N.P. Mohapatra, M.B. Perry, E. Vinogradov, R.W. Carlson, J.S. Gunn // *Frontiers in Microbiology*. – 2010. – V. 1. – P. 129. doi:10.3389/fmicb.2010.00129.
- 250 Sorokin, V.M. *Francisella tularensis* resistance to bactericidal action of normal human serum / V.M. Sorokin, N.V. Pavlovich, L.A. Prozorova // *Fems Immunology And Medical Microbiology*. – 1996. – V. 13. – P. 249-252.
- 251 Splettstoesser, W. Evaluation of an immunochromatographic test for rapid and reliable serodiagnosis of human tularemia and detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in sera from different mammalian species. / W. Splettstoesser, V. Guglielmo-Viret, E. Seibold, P. Thullier // *Clinical Microbiology*. – 2010. – V. 48. – P. 1629-1634.
- 252 Splettstoesser, W.D. Diagnostic procedures in tularemia with special focus on molecular and immunological techniques. / W.D. Splettstoesser, H. Tomaso,

- S. Al Dahouk, H. Heubauer, P. Schuff-Werner // Journal of veterinary medicine. – 2005. – V. 52. – P. 249-61.
- 253 Stenmark, S. Rapid Local Expression of Interleukin-12, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Gamma Interferon after Cutaneous *Francisella tularensis* Infection in Tularemia-Immune Mice. / S. Stenmark, D. Sunnemark, A. Bucht, A. Sjöstedt, R.N. Moore, ed. // Infection and Immunity. – 1999. – V. 67. – P. 1789-1797.
- 254 Stenmark, S. Specific antibodies contribute to resistance to the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* and their absence in B-cell-deficient mice explains the failure of the mice to mount an effective acquired resistance / S. Stenmark, H. Lindgren, A. Sjöstedt. // Abstr. the 3rd Int. Conf. on Tularemia. - Sweden, Umea. – 2000. – P. 67
- 255 Sundaresh, S. From protein microarrays to diagnostic antigen discovery: a study of the pathogen *Francisella tularensis*. / S. Sundaresh, A. Randall, B. Unal, J.M. Petersen, J.T. Belisle, M.G. Hartley, M. Duffield, R.W. Titball, D.H. Davies, P.L. Felgner, P. Baldi. // Bioinformatics. – 2007. – V. 23. – P. i508–i518. doi:10.1093/bioinformatics/btm207
- 256 Syrjälä, H. A whole-blood lymphocyte stimulation test for the diagnosis of human tularemia / H. Syrjälä, E. Herva, J. Ilonen, K. Saukkonen, A. Salminen // The Journal of Infectious Diseases. – 1984. – V. 150. – P. 912-915
- 257 Syrjälä, H. Agglutination and ELISA methods in the diagnosis of tularemia in different clinical forms and severities of the disease / H. Syrjälä, P. Koskela, T. Ripatti, A. Salminen, and E. Herva. // The Journal of Infectious Diseases. – 1986. – V. 153. – P. 142-145.
- 258 Syrjälä, H. Airborne transmission of tularemia in farmers. / H. Syrjälä, P. Kujala, V. Myllylä, A. Salminen. // Scandinavian Journal of Infectious Diseases. – 1985. – V. 17. – P. 371–375.
- 259 Tärnvik, A. *Francisella tularensis* – a model for studies of the immune response to intracellular bacteria in man. / A. Tärnvik, M. Eriksson,

- G. Sandström, A. Sjöstedt. // Immunology. – 1992. – V. 76. – P. 349-354.
- 260 Tärnvik, A. Long-lasting cell-mediated immunity induced by a live *Francisella tularensis* vaccine. / A. Tärnvik, M.L. Löfgren, S. Löfgren, G. Sandström, and H. Wolf-Watz. // Clinical Microbiology. – 1985. – V. 22. – P. 527-530.
- 261 Tärnvik, A. Stimulation of human lymphocytes by a vaccine strain of *Francisella tularensis*. / A. Tärnvik, and S. Löfgren. // Infection and Immunity. – 1975. – V. 12. – P. 951-957.
- 262 Tärnvik, A. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. / A. Tärnvik, M.C. Chu. // Annals of the New York Academy of Sciences – 2007. – V. 1105. – P. 378-404.
- 263 Tarnvik, A. Nature of protective immunity to *Francisella tularensis*. / A. Tarnvik. // Reviews of infectious diseases. – 1989. – V. 11. – P. 440-451.
- 264 Tarnvik, A. Orchestration of the protective immune response to intracellular bacteria: *Francisella tularensis* as a model organism. / A. Tarnvik, M. Ericsson, I. Golovliov et al. // FEMS Immunology & Medical Microbiology. – 1996. – V. 13. – P. 221-225.
- 265 Telepnev, M. *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor- mediated activation of intracellular signaling and secretion of TNF- α and IL-1 from murine macrophages. / M. Telepnev, I. Golovliov, T. Grundstrom et al. // 1 Cellular microbiology. – 2003. – V. 5. – P. 41-51
- 266 Thakran, S. Identification of *Francisella tularensis* lipoproteins that stimulate the toll-like receptor (TLR) 2/TLR1 heterodimer. / S. Thakran, H. Li, C.L. Lavine, et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2008. – V. 283. – P. 3751-60.
- 267 Thirumalapura, N.R. Lipopolysaccharide microarrays for the detection of antibodies. / N.R. Thirumalapura, R.J. Morton, A. Ramachandran, J.R. Malayer // Journal of Immunological Methods. – 2005. – V. 298. – P. 73-81.

- 268 Thirumalapura, N.R. Bacterial cell microarrays for the detection and characterization of antibodies against surface antigens. / N.R. Thirumalapura, A. Ramachandran, R.J. Morton, J.R. Malayer // Journal of Immunological Methods. – 2006. – V. 309. – P. 48-54.
- 269 Thomas, R.M. The Immunologically Distinct O Antigens from *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* and *Francisella novicida* Are both Virulence Determinants and Protective Antigens. / R.M. Thomas, R.W. Titball, P.C.F. Oyston, et al. // Infection and Immunity. – 2007. – V. 75. – P. 371-378
- 270 Thomas, R. Discrimination of Human Pathogenic Subspecies of *Francisella tularensis* by Using Restriction Fragment Length Polymorphism. / R. Thomas, A. Johansson, B. Neeson, et al. // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – V. 41. – P. 50-57. doi:10.1128/JCM.
- 271 Timofeev, V. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. / V. Timofeev, I. Bakhteeva, G. Titareva, et al. A.K. Murthy, ed. // PLoS ONE. – 2017. – V. 12. – P. :e0183714. doi:10.1371/journal.pone.0183714.
- 272 Tindall B. J., Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. / B.J. Tindall, P. Kampf, J.P. Euzéby, A. Oren. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2006. – V. 56. – P. 2715–2720. 10.1099/ijms.0.64780-0
- 273 Tochtamysheva, N.V. Monoclonal antibody analysis of LPS from *Francisella tularensis* / N.V. Tochtamysheva, V.S. Khlebnikov, S.S. Vetchinin // Abstr. the 2nd Int. Conf. on Tularemia. - Czech Republic, Hradec Kralove. 1997. – P. 20-21.
- 274 Tsai, C.M. A sensitive silverstain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. / C.M. Tsai, C.E. Frash // Analytical Biochemistry. – 1982. – V. 119. – P. 115-119.
- 275 Twine, S. BALB/c mice, but not C57BL/6 mice immunized with a Δ clpB mutant of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* are protected against

- respiratory challenge with wild-type bacteria: association of protection with post-vaccination and post-challenge immune responses. / S. Twine, H. Shen., G. Harris. // *Vaccine*. – 2012. – V. 75(30). – P. 3634-3645.
- 276 Twine, S.M. Immunoproteomic analysis of the murine antibody response to successful and failed immunization with live anti-*Francisella* vaccines. / S.M. Twine, M.D. Petit, H. Shen, N.C. Mykytczuk, J.F. Kelly, et al. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2006. – V. 346. – P. 999-1008.
- 277 Twine, S.M. Immunoproteomics Analysis of the Murine Antibody Response to Vaccination with an Improved *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain (LVS). / S.M. Twine, M.D. Petit, K.M. Fulton, R.V. House, J.W. Conlan R. Tripp, ed. // *PLoS ONE*. – 2010. – V. 5. – P. e10000. doi:10.1371/journal.pone.0010000.
- 278 Twine, S.M. In vivo proteomic analysis of the intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis*, isolated from mouse spleen. / S.M. Twine, N.C. Mykytczuk, M. Petit, H. Shen, A. Sjostedt, J.W. Conlan, J.F. Kelly. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2006. – V. 345. – P. 1621-1633. 10.1016/j.bbrc.2006.05.070
- 279 Vinogradov, E. Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. / E. Vinogradov, M. B. Perry, J. W. Conlan. // *European Journal Of Biochemistry*. – 2002. – V. 269 – P. 6112-6118
- 280 Vinogradov, E.V. Structure of the O-antigen of *Francisella tularensis* strain 15. / E.V. Vinogradov, A.S. Shashkov, Y.A. Knirel, N.K. Kochetkov, N.V. Tochtamysheva, S.F. Averin, O.V. Goncharova, V.S. Khlebnikov. // *Carbohydr Res*. – 1991. – V. 214. – P. 289-297
- 281 Waag, D.M Immunogenicity of a new lot of *Francisella tularensis* live vaccine strain in human volunteers. / D.M. Waag, G. Sandström, M.J. England, J.C. Williams. // *Fems Immunology And Medical Microbiology*. – 1996. – V. 13. – P. 205-209
- 282 Waag, D.M. Cell-mediated and humoral immune responses after vaccination

- of human volunteers with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* / D.M. Waag, K.T.Jr. McKee, G. Sandstrom, L.L. Pratt, C.R. Bolt, M.J. England, G.O. Nelson, J.C. Williams // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 1995. – N 2. – P. 143-148
- 283 Wang, Y.H. A case of *Francisella tularensis* subspecies holarctica in China. / Y.H. Wang, F.Y. Qiao, J. Cao, et al. // Ticks Tick Borne Dis – 2015. – № 6. – P. 802-4.
- 284 Wang, X. Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. novicida. / X. Wang, A.A. Ribeiro, Z. Guan, S.C. McGrath, R.J. Cotter, C.R. Raetz. // Biochemistry. – 2006. – V. 45. – P. 14427-40.
- 285 Washburn, A.M. Acupuncture heroin detoxification: a single-blind clinical trial. / A.M. Washburn, R.E. Fullilove, M.T. Fullilove, P.A. Keenan, B. McGee, K.A. Morris, et al. // Journal of Substance Abuse Treatment – 1993. – V. 10. – P. 345-51
- 286 Westphal, O. Bacterial Lipopolysaccharides. Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. / Westphal, O. and Jann, K. // Methods in Carbohydrate Chemistry. – 1965. – V. 5. – P. 83-91.
- 287 Wetmur, J.G. Kinetics of renaturation of DNA / J.G. Wetmur, N.J. Davidson. // J. Mol. Biol. – 1968. – V. 31. – P. 349.
- 288 Whipp, M.J. Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. / M.J. Whipp, J.M. Davis, G. Lum, J. de Boer, Y. Zhou, S.W. Bearden, J.M. Petersen, M.C. Chu, G. Hogg. // J Med Microbiology. – 2003. – V. 52. – P. 839-842. doi: 10.1099/jmm.0.05245-0
- 289 Wik, O. Large tularaemia outbreak in Värmland, central Sweden. / O. Wik. // Euro Surveill – 2006. – V. 11. – P. 3052
- 290 Winkler, S. Increased specific T cell cytokine responses in patients with active pulmonary tuberculosis from Central Africa / S. Winkler, M. Necek, H. Winkler, A.A. Adegnika, T. Perkmann, et al. // Microbes Infection – 2005.

– V. 5. – P. 1161-1169

- 291 Wu, T.H. Intranasal vaccination induces protective immunity against intranasal infection with virulent *Francisella tularensis* biovar A. / T.H. Wu, J.A. Hutt, K.A. Garrison, L.S. Berliba, Y. Zhou, C.R. Lyons // *Infection and Immunity*. – 2005. – V. 73. – P. 2644-2654.
- 292 Xin-He Lai, A.S. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. / A.S. Xin-He Lai. // *Infection and Immunity*– 2003. – V. 71. – P. 4642-4646.
- 293 Yee, D. Loss of either CD4+ or CD8+ T cells does not affect the magnitude of protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS / D. Yee, T.R. Rhinehart-Jones, K.L. Elkins // *Journal of Immunology*. – 1996. – V. 157. – P. 5042-8
- 294 Zarrella, T.M. Host-adaptation of *Francisella tularensis* alters the bacterium's surface-carbohydrates to hinder effectors of innate and adaptive immunity / T.M. Zarrella, A. Singh, C. Bitsaktsis, et al. // *PLoS One*. – 2011. – V. 6 – P. e22335.