ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»

На правах рукописи

Мокриевич Александр Николаевич

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ДИАГНОСТИКИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

03.02.03 – микробиология,

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научные консультанты:

чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор Дятлов И.А.,

д.м.н., профессор Анисимов А.П.

Оболенск-2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 8
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 48
1.1 Общие сведения о туляремийной инфекции 48
1.2 Эпидемиология туляремии 50
1.2.1 Туляремия в бывшем Советском Союзе и в России 53
1.2.2 Туляремия в странах Европы 58
1.2.3 Туляремия в Северной Америке 61
1.3 Внутривидовое разнообразие возбудителя туляремии 64
1.3.1 Таксономия *Francisella tularensis* 64
1.3.2 Молекулярно-генетическая видовая и подвидовая идентификация возбудителя туляремии 68
1.3.3 Генетические основы биохимических различий подвидов *F. tularensis* 82
1.4 Туляремийные вакцины 90
1.4.1 История создания и использования живой туляремийной вакцины 90
1.4.2 Сравнительная характеристика эффективности туляремийных вакцин 92
1.4.3 Иммунные реакции макроорганизма при введении живой туляремийной вакцины 96
1.4.4 Современные подходы к созданию улучшенной живой туляремийной вакцины 105
1.5 Основные подходы к изучению потенциальных туляремийных вакцинных штаммов 115
1.5.1 Существующие требования к оценке туляремийной живой вакцины 115
1.5.2 Новые методические приемы при изучении потенциальных туляремийных вакцинных штаммов 119
1.5.3 Использование лабораторных животных для экспериментальной туляремии при разработке вакцин против этого заболевания 121
1.6 Заключение по обзору литературы 131
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
Глава 2 ГЕНОДИАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА 134
2.1 Создание тест-системы «MULTI-FLU» для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов 134
2.1.1 Обоснование выбора праймеров и зондов 138

2.1.2 Подбор условий амплификации 139
2.1.3 Оценка аналитической специфичности 140
2.1.4 Проверка зашифрованных проб набором для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов 142
2.2 Создание праймера Chi 1f для дифференциации подвидов туляремийного микроба 145
2.2.1 Создание системы из одного праймера для дифференциации подвидов туляремийного микроба на основе специфических регионов хромосомы фланкированных chi – последовательностями, подобными *E. coli* 146
2.2.2 Результаты испытаний ПЦР с использованием одного праймера Chi1f для дифференциации подвидов туляремийного микроба 146
2.3 Генотипирование штаммов туляремийного микроба 148
2.3.1 Изучение генотипического разнообразия штаммов *F. tularensis* из коллекции ГНЦ ПМБ методом MLVA-типирования по 25 VNTR-локусам 149
2.3.2 Обнаружение на территории Алтайского края Российской Федерации *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 159
2.3.3 Оптимизирование числа VNTR-локусов, сохраняющее разрешающую способность MLVA-типирования на уровне метода A. Johansson 163
2.4 Обсуждение результатов 165
Глава 3 НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ГЕНОВ *F. TULARENSIS* 171
3.1 Конструирование суицидного плазмидного вектора pGM5 для аллельного обмена генов в хромосоме *F. tularensis* 172
3.2 Конструирование суицидного плазмидного вектора pGM6 175
3.3 Создание с помощью суицидных векторов pGM5 и pGM6 плазмид с инактивированными генами оперонов *igl, rec, qse, pur* и *bla* и получение вариантов штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ с делецией перечисленных генов 177
3.3.1 Конструирование штамма с делецией гена *qseC* на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 177
3.3.2 Конструирование штамма с делецией генов *purMCDN* на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 181
3.3.3 Конструирование штамма с делецией гена *iglC* (одной и двух копий) на основе штамма 15 НИИЭГ *F. tularensis* 183
3.3.4 Конструирование штаммов с делецией генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 186

3.3.5 Конструирование штаммов с делецией генов *bla1, bla2, bla3* на основе штамма 15 НИИЭГ *F. tularensis* 192
3.4 Обсуждение результатов 197
Глава 4 ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНОВ *QSEC, PUR, RECA, RECD, IGLC* И *BLA* НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *F. TULARENSIS* 202
4.1 Влияние гена *qseC* на иммунобиологические свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 202
4.1.1 Влияние гена *qseC* на культурально-морфологические свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 202
4.1.2 Влияние гена *qseC* на чувствительность к нормальной кроличьей сыворотке штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 203
4.1.3 Влияние гена *qseC* на способность рекомбинантного штамма к фагоцитозу и приживаемости в организме мышей линии BALB/c 204
4.1.4 Влияние гена *qseC* на остаточную вирулентность и протективные свойства *F. tularensis* 15 НИИЭГ 208
4.1.5 Влияние делеции гена *qseC* на структуру липополисахарида внешней мембраны штамма 15 НИИЭГ *F. tularensis* 210
4.2 Влияние генов *purMCDN*, кодирующих ферменты биосинтеза пуринов, на иммунобиологические свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 214
4.2.1 Влияние генов *purMCDN* на культурально-морфологические свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 215
4.2.2 Влияние генов *purMCDN* на чувствительность к нормальной кроличьей сыворотке 216
4.2.3 Влияние генов *purMCDN* на способность рекомбинантного штамма к фагоцитозу и приживаемости в организме мышей линии BALB/c 216
4.2.4 Влияние генов *purMCDN* на остаточную вирулентность и протективные свойства *F. tularensis* 15 НИИЭГ 219
4.3 Влияние гена *iglC* на иммунобиологические свойства вакцинного вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 221
4.3.1 Влияние гена *iglC* на культурально-морфологические свойства и чувствительность к нормальной кроличьей сыворотке 221
4.3.2 Влияние гена *iglC* на способность к фагоцитозу и приживаемости в организме мышей линии BALB/c 222
4.3.3 Оценка влияния гена *iglC* на степень остаточной вирулентности и протективные свойства штамма 225

F. tularensis 15 НИИЭГ
4.3.4 Влияние гена *iglC* на реактогенные свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (по изменению веса и гематологическим показателям мышей линии BALB/c) 226
4.3.5 Влияние инактивации гена *iglC* в вакцинном штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на формирование гуморального и клеточного иммунитета к туляремии у мышей линии BALB/c 231
4.4 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на иммунобиологические свойства вакцинного туляремийного штамма 233
4.4.1 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на культурально-морфологические свойства и чувствительность к нормальной кроличьей сыворотке штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 234
4.4.2 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на устойчивость штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ к ультрафиолетовому облучению и воздействию перекиси водорода 237
4.4.3 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на способность к фагоцитозу и приживаемости в организме мышей линии BALB/c 238
4.4.4 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на степень остаточной вирулентности и протективные свойства 241
4.4.5 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на реактогенные свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (по изменению веса и гематологическим показателям мышей линии BALB/c) 242
4.4.6 Оценка влияния генов системы рекомбинации *recA* и *recD* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на формирование гуморального и клеточного иммуннитета при иммунизации мышей линии BALB/c 245
4.5 Влияние генов *bla* на иммунобиологические свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 247
4.5.1 Изучение чувствительности *F. tularensis* к антибиотикам класса β-лактамов 248
4.5.1.1 Сравнение чувствительности к β-лактамам штаммов *F. tularensis* в зависимости от подвидовой принадлежности 248
4.5.1.2 Определение чувствительности к антибиотикам штаммов *F. tularensis* с инактивированными генами β- 252

лактамаз
4.5.1.3 Комплементация чувствительности к ампициллину плазмидами, несущими маркер ампициллин-резистентности 255
4.5.1.4 Изучение сравнительной β-лактамазной активности *F. tularensis* subsps. *mediasiatica* и *holarctica* и штаммов *F. tularensis* 15Δ*bla*2 и *F. tularensis* 15Δ*bla*123 256
4.5.2 Влияние генов *bla* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на ростовые и иммунопротективные свойства штамма 259
4.6 Обсуждение результатов 261
Глава 5. ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММА *F. TULARENSIS* 15/23-1ΔRECA – ПРОТОТИПА ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ 270
5.1 Сравнительная оценка культурально-морфологических и иммунобиологических свойств прототипа живой туляремийной вакцины *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* и родительского штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 270
5.1.1 Изучение культурально-морфологических свойств штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* 270
5.1.2 Изучение способности штамма *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA к внутриклеточному размножению в культуре первичных перитонеальных макрофагов и в культуре макрофагоподобных клеток линии J774.1A 272
5.2 Оценка остаточной вирулентности, безвредности, стабильности и реактогенности, иммуногенных и защитных свойств прототипа живой туляремийной вакцины 274
5.2.1 Определение остаточной вирулентности штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* для морских свинок и мышей линии BALB/c 275
5.2.2 Оценка приживаемости штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* по степени и длительности обсемененности селезенки морских свинок и мышей линии BALB/c 276
5.2.3 Оценка патоморфологических изменений у морских свинок и мышей линии BALB/c, вызываемых введением штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* 278
5.2.4 Определение стабильности биологических свойств испытуемого вакцинного штамма на морских свинках 281
5.2.5 Оценка реактогенности штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* по изменению веса морских свинок и мышей линии BALB/c 282
5.2.6 Оценка влияния штаммов *F. tularensis* 15НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* на гематологические показатели морских свинок и мышей линии BALB/c 286

5.2.7 Оценка формирования гуморального и клеточного иммунного ответа на штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* у морских свинок и мышей линии BALB/c 289
5.2.8 Оценка иммуногенной активности штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* для морских свинок и мышей линии BALB/c 292
5.2.9 Сравнение длительности и напряженности иммунитета у мышей линии Balb/c при иммунизации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* 293
5.3 Обсуждение результатов 297
Глава 6 АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ ШТАММОВ *F. TULARENSIS* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КАНДИДАТОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ УЛУЧШЕНОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ 301
6.1 Использование клеточной линии J774.1A на первом этапе исследований кандидат-вакцин 301
6.2 Использование динамики изменения веса и гематологических показателей мышей линии BALB/c в качестве критериев реактогенности потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы 303
6.3 Определение специфического иммунитета с использованием комплексного туляремийного антигена (УЗД) *F. tularensis* 15 НИИЭГ в качестве критерия иммуногенности потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы 304
6.4 Обсуждение результатов 305
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 309
ВЫВОДЫ 317
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 320
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ 321
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ 323
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 326

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Туляремия – зоонозная природно-очаговая особо опасная инфекция, вызываемая грамотрицательной коккобациллой *Francisella tularensis*. Возбудитель туляремии был впервые выделен в 1911 г. от сусликов с симптомами заболевания, подобными чуме, в графстве Туляре (Tulare), Калифорния (США) [55]. Практически во всех странах северного полушария (кроме Англии и Исландии) в ареале между 30º и 70º с. ш. существуют эндемичные районы циркуляции этого возбудителя.

В пределах вида *F. tularensis* выделяют четыре подвида: *tularensis* (*nearctica*) – тип А, *holarctica* (*palaearctica*) – тип В, *mediasiatica* и *novicida*. Разные подвиды *F. tularensis* отличаются степенью патогенности [137]. Наибольшей вирулентностью для человека обладает североамериканский подвид *tularensis (nearctica)* [174]. Выделяемые в Европе штаммы *F. tularensis* являются менее вирулентными и относятся к подвиду *holarctica*. По поводу вирулентности среднеазиатского подвида *F. tularensis* – subsp. *mediasiatica* – опубликованы немногочисленные данные, свидетельствующие о способности этих бактерий вызывать инфекцию у человека и кроликов [57]. Штаммы подвида *mediasiatica* выделяли только на территории Средней Азии [55], данные о выделении этого подвида на территории Российской Федерации до последнего времени отсутствовали. *F. tularensis* subsp. *novicida* считают условно патогенной для человека – единичные случаи выделения этого подвида от людей касались только лиц со сниженным иммунным статусом [309].

Следует отметить, что для бактерий *F. tularensis* характерен высокий консерватизм фенотипа (антигенная и биологическая однородность, невысокая биохимическая активность и др.) [55]. Применяемые современной наукой для подвидовой идентификации туляремийного микроба методы молекулярного типирования [272, 372, 389] обладают как достоинствами, так и недостатками, которые связаны со сложностью методик, воспроизводимостью и оценкой

результатов. Универсальных методов молекулярно-генетического типирования штаммов микроорганизмов, отвечающих всем потребностям современной клинической микробиологии и эпидемиологической генодиагностики, на момент начала наших исследований не было предложено. Разработка комплекса генодиагностических методов, позволяющих относить выделенные изоляты к определенному подвиду и генетическому кластеру, имеет исключительно важное значение для развития современного уровня эпидемиологических расследований эпизоотий и вспышек туляремии, совершенствования эффективных средств инфекционной диагностики, выбора оптимальных молекулярных мишеней при создании диагностических систем нового поколения.

Широкая распространенность туляремии в природе [96, 350], высокая инфекционность и летальность для человека при отсутствии лечения, возможность аэрозолирования и легкость распространения возбудителя во внешней среде [185] обусловливают необходимость вакцинации населения в эндемичных районах и в группах риска. Ежегодно в России против туляремии прививают более 1,5 млн. человек (только в 2012 г было вакцинировано 275 559 человек и ревакцинировано 1 240 626 человек) [13]. Периодическое возникновение вспышек массовых заболеваний у людей (более 1000 зарегистрированных случаев в г. Нижневартовск в 80-е годы прошлого столетия, 1005 заболевших во время вспышки в августе-сентябре 2013 г. в г. Ханты-Мансийске и Ханты-Мансийском районе) свидетельствуют о достаточно высокой потенциальной опасности туляремии для человека [63, 64].

В настоящий момент эффективную защиту против туляремии обеспечивают только живые вакцины, полученные на основе аттенуированных штаммов. Два существующих вакцинных штамма *F. tularensis* − LVS и 15 НИИЭГ − обеспечивают формирование напряженного иммунитета против туляремии [461]. Однако существующие вакцинные штаммы обладают рядом недостатков, в частности, они генетически не детерминированы и относительно

высокореактогенны, поэтому их применение является небезопасным для детей и людей с ослабленным иммунитетом.

Основными критериями при отборе новых туляремийных вакцинных штаммов являются, прежде всего, сниженная реактогенность при сохранении протективных свойств, генетическая стабильность и маркированность для дифференциации их от природных штаммов. Решение этих задач возможно путем проведения направленного мутагенеза целевых генов *F. tularensis*.

Генно-инженерные манипуляции с туляремийным микробом начались с разработки метода криотрансформации клеток *F. tularensis* гетерологичными плазмидами pC194 и pHV33 [44] и получения вектора pHVT [64]. Первая гомологичная для туляремийного микроба плазмида была обнаружена в штамме *Francisella novicida-like* F6168 [254]. В дальнейшем она была выделена и охарактеризована [67, 389] и на ее основе сконструирована векторная плазмида, стабильно наследующаяся клетками туляремийного микроба [379].

Ранее с участием автора был разработан метод аллельного обмена генов в хромосоме туляремийного микроба, основанный на межвидовой мобилизации рекомбинантных плазмид, созданных с использованием плазмидного вектора pPV [232]. Совершенствование генетического инструментария путем конструирования новых суицидных векторов, облегчающих проведение сайт-направленного мутагенеза, имеет большое значение при разработке стратегии целенаправленного выключения генов-мишеней на новом, генетически детерминированном уровне. Это позволит как получать новые вакцинные штаммы, обеспечивающие эффективный иммунитет против туляремии [275], так и изучать генетические основы биохимических различий для подвидовой дифференциации туляремийного микроба.

Таким образом, разработка комплекса генодиагностических методов, позволяющих относить выделенные изоляты к определенному подвиду и генетическому кластеру при эпидемиологических расследованиях эпизоотий, спорадических случаев и вспышек туляремии, безусловно, имеет важное значение. Не менее актуальной является также проблема конструирования новых

туляремийных вакцин путем создания штаммов с целенаправленно выключенными генами-мишенями.

Степень разработанности темы исследования

Работы по изучению туляремии были начаты американским исследователем Эдвардом Фрэнсисом [216], но общепризнано, что наиболее значительный вклад в исследования туляремии внесли в 30-х–70-х г.г. прошлого века советские ученые - Николай Григорьевич Олсуфьев с коллегами, которыми были определены природные очаги инфекции и предложена классификация возбудителя [55].

На территории европейских стран и в странах Азии туляремия привлекала внимание многих исследователей, которые, как правило, описывали только вспышки туляремии [176, 213, 277, 458]. Проведенный A. Desvars с соавторами анализ эпидемиологии и экологии туляремии в Швеции в период с 1984 по 2012 г.г. показал, что из зарегистрированных 4830 случаев заболевания 3524 отвечают всем критериям туляремии.

Подробные эпидемиологические исследования в течение многих десятилетий в бывшем Советском Союзе, в странах Восточной Европы и США убедительно свидетельствуют, что при описании эпидемиологии туляремии необходимо учитывать существенные различия между типами *F. tularensis*: *tularensis* – тип А, *holarctica* – тип В, которые отличаются по вирулентности для некоторых млекопитающих (в частности, зайцеобразных). Эти предложения по таксономическому упорядочиванию *F. tularensis* также принадлежат российскому ученому-микробиологу Н.Г. Олсуфьеву – в 1959 г. он впервые предложил разделение туляремийного микроба на два типа – А и Б, различающиеся по ареалу распространения и вирулентности [53]. В настоящее время изучение внутривидовой классификации *F. tularensis* активно продолжают ученые разных стран. Для видовой и подвидовой идентификации *F. tularensis* используют методы молекулярного типирования: определение

межгенных повторяющихся (ERIC-PCR) и внегенных палиндромных последовательностей (REP-PCR), применение универсальных (случайных) праймеров в системе RAPD-PCR [391], анализ полиморфизма единичных нуклеотидов – SNP-типирование [374], метод мультилокусного VNTR-типирования *F. tularensis* (MLVA) [274]. MLVA-типирование с использованием 25 VNTR-локусов является одним из наиболее успешных методов, применимых для внутривидового типирования *F. tularensis*. Он позволяет не только отнести исследуемый штамм к тому или иному подвиду, но и определить географический регион его происхождения. Многие исследователи для уменьшения трудозатрат пытаются уменьшить набор VNTR-маркеров, несколько снижая при этом разрешающую способность метода [127, 142, 202, 231, 490]. А. С. Водопьянов изучил генетическое разнообразие коллекции из 352 штаммов *F. tularensis*, выделенных в различных регионах мира в период с 1941 по 2004 г.г., с помощью MLVA по 4 VNTR-локусам [7]. A. Vogler для генотипирования *F. tularensis* предложил MLVA-систему с редуцированным до 11 количеством VNTR-маркеров [473]. Анализ идентификационных генотипов исследованных штаммов позволил сгруппировать их в 61 вариант. Таким образом, оптимизация количества анализируемых VNTR-локусов с сохранением разрешающей способности метода для определенных выборок остается актуальной задачей.

Традиционно различия подвидов туляремийного микроба определяли по биохимическим признакам, одним из которых является β-лактамазная активность. Изучение доступной литературы показало, что вопрос о наличии внутривидовых различий по признаку β-лактамазной активности и их генетических основах, как потенциальных мишеней для ПЦР-дифференциации среднеазиатского подвида возбудителя туляремии, ранее не рассматривался. Поиск генетических мишеней, которые присутствовали бы лишь у одного из подвидов и имели определенное фенотипическое проявление, представляется интересным.

Работы по созданию вакцины против туляремии проводились практически с момента выделения этого возбудителя и были достаточно удачно решены Н.А. Гайским в 1945 г. получением живой туляремийной вакцины. В последующем этот штамм был доработан и используется до настоящего времени в России как туляремийная вакцина на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [55]. В странах Западной Европы и Северной Америки в экспериментальных целях применяют живую вакцину на основе штамма *F. tularensis* LVS (Live Vaccine Strain), полученного в результате многочисленных пассажей *F. tularensis* 15 *in vitro* [194]. Однако существующие недостатки вакцинного туляремийного штамма,

Создание вакцинных штаммов *F. tularensis* в настоящее время проводят на новом молекулярно-генетическом уровне, позволяющем целенаправленно снижать вирулентность путем направленной модификации выбранных экспериментатором генов [275]. Существенный вклад в изучение генов, отвечающих за вирулентность туляремийного микроба, внесли отечественные и зарубежные ученые [128, 131, 143, 203, 232, 235, 316, 320, 336]. Однако, несмотря на большое количество работ в этом направлении, сконструировать новую, достойную для внедрения в практику вакцину, пока не удалось, и исследования в этом направлении не потеряли актуальности. В настоящее время работы по созданию эффективных туляремийных вакцин стали более интенсивными. Это обусловлено, с одной стороны, возможностью использования этого патогена в качестве агента биотерроризма, а с другой – расширением спектра параметров оценки иммунного ответа, позволяющих более полно изучать патогенез и иммуногенез туляремии и на основе полученных данных целенаправленно создавать новые вакцины с улучшенными свойствами.

Цель исследования

Разработать современную методологию диагностики и профилактики туляремии для внедрения в практику здравоохранения простых и надежных способов лабораторной индикации и идентификации *F. tularensis*, а также усовершенствовать молекулярно-генетические подходы для создания улучшенных вакцинных препаратов.

Задачи исследования:

1. В рамках совершенствования современной клинической микробиологии и эпидемиологической генодиагностики разработать и апробировать мультиплексные ПЦР тест-системы для экспресс-определения видовой и внутривидовой принадлежности *F. tularensis*.
2. С целью изучения молекулярных основ эпидемического процесса в очагах туляремии на территории РФ и проведения молекулярно-филогенетических исследований охарактеризовать генотипическую гетерогенность коллекции природных штаммов *F. tularensis*, находящихся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболенск»), методом MLVA-типирования и оптимизировать этот метод, сократив количество анализируемых VNTR-локусов при сохранении его разрешающей способности.
3. Для оценки влияния ряда генов на вакцинные свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и изучения генетических детерминант β-лактамазной активности *F. tularensis* сконструировать и оптимизировать векторы для сайт-направленного мутагенеза и получить модифицированные варианты туляремийного микроба.
4. Изучить биологические и иммуногенные свойства полученных нокаутных мутантов туляремийного микроба по генам *iglC*, *recA*, *recD*, *qseC*, *purMCDN* в системах *in vitro* и *in vivo* и на основе анализа их свойств выбрать гены-мишени для создания кандидатной вакцины с улучшенными свойствами.

5. Используя выбранные гены-мишени, создать штамм с прогнозируемыми характеристиками и изучить его иммуногенные и протективные свойства в сравнении с существующей туляремийной вакциной на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на различных биологических моделях экспериментальной туляремии.
6. Разработать алгоритм отбора перспективных вакцинных штаммов *F. tularensis.*

Научная новизна исследования

Выявлен новый природный очаг туляремии, в котором циркулирует *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* за пределами Средней Азии - на территории Южной Сибири (Алтайский край) Российской Федерации, что позволяет существенно пересмотреть современные представления о филогеографии туляремийного микроба. Впервые с помощью полногеномного секвенирования определена нуклеотидная последовательность генома штамма алтайского геноварианта *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, которая депонирована в GenBank NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA244815).

По результатам MLVA25-типирования в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболенск») выделен кластер штаммов *F. tularensis*, MLVA-профили которых несут генетические черты двух подвидов: *tularensis* и *holarctica.*

Установлено, что инактивация гена *recA* системы рекомбинации *F. tularensis* приводит к значительному снижению способности к гомологичной рекомбинации и, как следствие, к стойкому сохранению свойств штамма, что позволяет использовать мутации по этому гену для стабилизации наследуемых свойств при создании новых вакцинных штаммов.

Впервые показано, что инактивация одной копии гена *iglC* и гена *recA* в геноме вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ стабильно снижает его реактогенные свойства при сохранении протективного потенциала.

Получены доказательства, что делеция оперона *purMCDN* повышает потребность в источнике экзогенных пуринов для *F. tularensis*. Мутантные штаммы (как вакцинный, так и вирулентный) теряют способность размножаться в макрофагоподобных клетках и становятся авирулентными для животных.

Обнаружено, что лактамазы Bla1 и Bla3 являются функционально неактивными по отношению ко всем группам используемых в клинической практике β-лактамов, а устойчивость к ним обеспечивает только сериновая β-лактамаза Bla2. Ген *bla2* может использоваться как мишень при создании лабораторных штаммов, пригодных для генно-инженерных работ с использованием плазмид, несущих маркеры устойчивости к β-лактамам.

Впервые показано, что штаммы среднеазиатского подвида несут набор генов, кодирующих β-лактамазы, идентичный штаммам других подвидов, и обладают β-лактамазной активностью. Однако скорость гидролиза антибиотиков у них значительно снижена, что и используется в качестве диагностического признака идентификации среднеазиатского подвида. Снижение скорости гидролиза β-лактамов связано, скорее всего, с единичными нуклеотидными заменами в гене *bla2*.

Разработана методология конструирования штаммов с заданными свойствами, включающая выбор генов-мишеней, создание молекулярно-генетических инструментов для инактивации/модификации целевых генов, получение панели штаммов с инактивированными генами и изучение их иммунобиологических свойств, позволившая получить штамм со сниженной реактогенностью при сохранении протективных свойств исходного вакцинного штамма.

Теоретическая и практическая значимость исследований

Сформированы и научно обоснованы подходы к выбору молекулярных мишеней для целенаправленной модификации генов с целью создания живых вакцинных препаратов против туляремии, что позволило значительно

расширить современные знания о механизмах патогенеза и иммуногенеза этого заболевания.

Дополнены современные представления о микроэволюции и разнообразии внутривидовых групп туляремийного микроба. Предложена эволюционная модель появления и распространения среднеазиатского подвида туляремийного микроба, циркулирующего на территории Южной Сибири (Алтайский край), согласно которой среднеазиатский подвид произошел от проникшего из Америки в Евразию *F. tularensis* subsp. *tularensis*, миграция которого на запад вдоль цепи водоемов сопровождалась снижением вирулентности и уменьшением лактамазной активности. Алтайская популяция *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* является, вероятно, эволюционно более древней, чем Среднеазиатская, так как находится значительно восточнее.

Выдвинута гипотеза о вероятности существования эволюционно более древней, чем голарктический подвид, ветви *F. tularensis*, являющейся, возможно, переходной формой от subsp. *tularensis* к subsp. *holarctica* на основании данных MLVA-типирования и выявления отдельной филогенетической группы Nevada, содержащей признаки голарктического и неарктического подвидов *F. tularensis.*

Результаты проведенных исследований послужили основой или были учтены при составлении нормативно-методических документов федерального уровня внедрения: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2642-10 «Профилактика туляремии» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 01 августа 2010 г.); Методические указания МУК 4.2.2939-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 14 июля 2011 г.); Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» (под ред. Г.Г. Онищенко и В.В. Кутырева, изд. 2-е, перераб. и доп., 2013 г.).

Разработан и рекомендован к применению способ одновременной регистрации ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме реального времени. Зарегистрирован в Росздравнадзоре (регистрационное удостоверение на медицинское изделие № РЗН 2013/1359 от 23 января 2014 г.) «Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме реального времени “MULTU-FLU” по ТУ 9398-157-78095326-2012». Получен патент на изобретение (№ 2542395 от 20.02.15 г.) «Набор реагентов и способ выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов». Набор реагентов “MULTU-FLU” изготавливается мелкосерийно на базе ФБУН ГНЦ ПМБ (акт внедрения от 24.07.2015).

Предложен метод ПЦР с использованием одного праймера, дающий возможность проведения дифференциации штаммов туляремийного микроба, принадлежащих к различным подвидам. Разработанная тест-система успешно прошла лабораторные внутренние и подготовлена для проведения технических испытаний (патент на изобретение «Способ дифференцирования подвидов туляремийного микроба» № 2478717 от 10.04.2013 г.).

Разработан и успешно апробирован алгоритм отбора потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis* на основании изучения иммунобиологических свойств панели штаммов, созданных путем целенаправленной модификации генов. Предложенный алгоритм направлен на оптимизацию оценки эффективности генетических модификаций при создании новых вакцинных штаммов.

Созданные оригинальные суицидные плазмидные векторы и способ их введения в клетки туляремийного микроба методом трансформации позволяют проводить сайт-направленный мутагенез генома *F. tularensis*. Штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* предложен в качестве прототипа туляремийной вакцины с улучшенными свойствами (патент на изобретение «Штамм *Francisella*

tularensis 15/23-1Δ*recA* со сниженной реактогенностью для создания живой туляремийной вакцины и способ его получения» № 2567810 от 10.11.2015 г.).

Определен минимальный набор из 17 VNTR-локусов, позволяющий в полном объеме сохранить достоверность получаемых данных о внутривидовой кластеризации исследованных штаммов *F. tularensis*. Оптимизированный метод MLVA-типирования дает возможность существенно упростить распределение по кластерам штаммов туляремийного микроба.

В «ГКПМ-Оболенск» депонированы 14 авторских штаммов, необходимых для изучения пато- и иммуногенеза туляремии и создания прототипов живой туляремийной вакцины с улучшенными свойствами (патенты на изобретение: «Способ стабилизации вакцинного туляремийного штамма» № 2457249 от 27.07.12 г., «Способ аттенуации вакцинного туляремийного штамма» № 2460791 от 10.09.2012). Штаммы *F. tularensis* 15Δ*bla2* и 15Δ*bla123* депонированы в «ГКПМ-Оболенск» как перспективные модели для генно-инженерных экспериментов с применением маркеров устойчивости к β-лактамным антибиотикам. Штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* предложен в качестве прототипа туляремийной вакцины с улучшенными свойствами.

Созданы, утверждены на учрежденческом уровне и внедрены в практическую работу лабораторий методические рекомендации: «Сайт-направленный мутагенез генома туляремийного микроба» (2003 г.), «Создание авирулентных штаммов *Francisella tularensis* голарктической расы в качестве потенциальных антитуляремийных вакцинных штаммов (2003 г.), «Создание модифицированных штаммов туляремийного микроба, перспективных для разработки современной живой вакцины» (2009 г.), «Индикация возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени» (2011 г.), «Проведение работ по характеризации изолятов *Francisella tularensis*» (2013 г.), «Определение минимальной бактерицидной концентрации (МБК) антибиотиков для *F. tularensis* колориметрическим методом» (2015 г.), «Методика оценки напряженности иммунитета к туляремии на

мышиной модели при иммунизации потенциальными вакцинными штаммами» (2015 г.).

Материалы диссертации используются в педагогическом процессе при чтении лекций и проведении практических занятий для слушателей курсов повышения квалификации на базе отдела образовательных программ и подготовки специалистов РосНИПЧИ «Микроб» (акт внедрения от 03.02.2016). Результаты исследования включены в лекционный материал при реализации программы подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре ФБУН ГНЦ ПМБ по направлению 06.06.01 – биологические науки (направленность программы - микробиология) (акт внедрения от 11.01.2016). Разработанные молекулярно-генетические подходы к исследованию возбудителя туляремии, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, применяются в Иркутском НИПЧИ при выполнении НИР 012-3-16 «Изучение биомедицинских особенностей туляремии и закономерностей функционирования природных очагов Сибири и Дальнего Востока» (акт внедрения от 22.01.2016). Материалы диссертации используются в работе по изучению природных очагов туляремии на юге России, подвидовой дифференциации и характеризации изолятов *F. tularensis*, изучению особенностей эпидемического процесса, выполняемых в рамках деятельности регионального научно-методического центра по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней Северо-Кавказского и Южного федеральных округов (акт внедрения от 10.02.2016).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована, исходя из современных принципов научного познания, и организована адекватно поставленной цели. Предметом исследования является возбудитель туляремии, совершенствование его диагностики и разработка вакцин против этого особо опасного заболевания. Анализ научной литературы, посвященной проблеме генодиагностики и вакцинопрофилактики, проведен на основе формально-

логических методов исследования. Планирование и проведение исследований осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов.

Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов: микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, иммунологических, оценке физиологического состояния животных, методов статистической обработки результатов.

Материалы

Штаммы микроорганизмов

В работе были использованы штаммы *F. tularensis* и гетерологичных микроорганизмов из “ГКПМ-Оболенск». Все исследования со штаммами выполнялись в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами [86,87]. Перечень всех использованных штаммов представлен в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Штаммы *F. tularensis* и *F. philomiragia,* использованные для MLVA-типирования

Название штамма	Подвид	Дата выделения	Место выделения
I-329	*holarctica*	1974	Республика Бурятия
I-346	*holarctica*	1978	Республика Бурятия
I-347	*holarctica*	1978	Республика Бурятия
I-349	*holarctica*	2006	Читинская обл.
I-365	*holarctica*	1988	Республика Бурятия
I-367	*holarctica*	1989	Читинская обл.
I-373	*holarctica*	1990	Читинская обл.
I-382	*holarctica*	1991	Республика Бурятия
I-387	*holarctica*	2011	Новосибирская обл.
I-388	*holarctica*	2011	Новосибирская обл.
1045	*holarctica*	2011	Алтайский край
15	*holarctica*	Н/Д	Московская обл.
503/840	*holarctica*	1980	Московская обл.
C-4	*holarctica*	1976	Грузинская ССР
C-7	*holarctica*	1967	Ставропольский край
C-12	*holarctica*	1974	Ставропольский край
C-13	*holarctica*	1959	Ставропольский край
345	*holarctica*	1983	Мурманская обл.

Продолжение таблицы 1

Название штамма	*Подвид*	Дата выделения	Место выделения
543/6	*holarctica*	1966	Среднеазиатский ПЧИ
55	*holarctica*	1974	Среднеазиатский ПЧИ
С-22	*holarctica*	1987	Азербайджанская ССР
С-24	*holarctica*	1985	Грузинская ССР
С-26	*holarctica*	1986	Калмыцкая АССР
С-28	*holarctica*	1985	Калмыцкая АССР
С-30	*holarctica*	1986	Ставропольский край
С-31	*holarctica*	1986	Ставропольский край
С-34	*holarctica*	1989	Краснодарский край
С-36	*holarctica*	1990	Краснодарский край
С-38	*holarctica*	1991	ДАССР
319/358	*holarctica*	1920	Красноярский край
С-51	*holarctica*	2000	Краснодарский край
С-55	*holarctica*	2000	Краснодарский край
С-56	*holarctica*	2000	Краснодарский край
С-58	*holarctica*	1991	ДАССР
С-62	*holarctica*	2003	Краснодарский край
С-64	*holarctica*	2003	Краснодарский край
С-65	*holarctica*	2003	Краснодарский край
С-66	*holarctica*	2003	Республика Калмыкия
С-67	*holarctica*	2003	Республика Калмыкия
С-68	*holarctica*	2003	Ставропольский край
С-69	*holarctica*	2003	Ставропольский край
С-70	*holarctica*	2003	Ставропольский край
С71	*holarctica*	2003	Ставропольский край
С-72	*holarctica*	2003	Ставропольский край
С-76	*holarctica*	2003	Ставропольский край
С-77	*holarctica*	2003	Ставропольский край
С-80	*holarctica*	2004	Краснодарский край
С-81	*holarctica*	2004	Краснодарский край
С-82	*holarctica*	2007	Краснодарский край
С-84	*holarctica*	2007	Краснодарский край
С-85	*holarctica*	2007	Краснодарский край
I-305	*holarctica*	1972	Читинская обл..
384*	*holarctica*	1946	Сталинградская обл.
2*	*holarctica*	1964	Краснодарский край
155*	*holarctica*	1949	Украина, Харьков
«ОН»*	*holarctica*	1954	Турция
«ГБ»*	*holarctica*	1954	Н/Д
BH 8859*	*holarctica*	1958	США
824*	*holarctica*	1961	Дагестанская АССР
457*	*holarctica*	1961	Краснодарский край
46/6*	*holarctica*	1942	Саратовская обл.
5-ground squirrels*	*holarctica*	1945	Ростовская обл.
309*	*holarctica*	1949	Украина, Полтавская обл.

Продолжение таблицы 1

Название штамма	*Подвид*	Дата выделения	Место выделения
0/284*	*holarctica*	1959	США
«Biryuchiy»*	*holarctica*	1962	Украина Херсонская обл.
503/840r*	*holarctica*	1949	Московская обл.
1r*	*holarctica*	1981	Ростов-на-Дону
34*	*holarctica*	1981	Ростов-на-Дону
323*	*holarctica*	1982	Украина, Черкасская обл.
250*	*holarctica*	1988	Ростовская обл.
162*	*holarctica*	1988	Ростовская обл.
16 b/sample №796*	*holarctica*	1989	Ростовская обл.
72*	*holarctica*	1989	Ростовская обл.
1*	*holarctica*	Н/Д	Н/Д
38*	*holarctica*	1987	Калмыцкая АССР
30*	*holarctica*	1989	Украина, Крымская обл.
627*	*holarctica*	1989	Украина, Крымская обл.
A-297(101)*	*holarctica*	1985	Уральская обл.
A-299(472)*	*holarctica*	1986	Казахская ССР
401*	*holarctica*	1987	Казахская ССР
777*	*holarctica*	1988	Уральская обл.
1203*	*holarctica*	1987	Уральская обл.
I-364*	*holarctica*	1988	Иркутская обл..,
I-365 R*	*holarctica*	1988	Бурятская АССР
I-367 R*	*holarctica*	1989	Красноярский край
3- 53*	*holarctica*	Н/Д	ГДР
R121/81*	*holarctica*	Н/Д	Швеция
R 8/88*	*holarctica*	Н/Д	Швеция
Kr-16*	*holarctica*	1989	Чехословакия
Japonski Downs*	*holarctica*	Н/Д	Болгария
Palacarctica Chatcauroux*	*holarctica*	Н/Д	Болгария
11*	*holarctica*	1989	Ростовская обл.
13*	*holarctica*	1989	Ростовская обл.
12*	*holarctica*	1989	Н/Д
517*	*holarctica*	1989	Ленинградская обл.
822*	*holarctica*	1989	Украина, Одесская обл.
325*	*holarctica*	1988	Калмыцкая АССР
134*	*holarctica*	1989	Крымская обл.
379*	*holarctica*	1991	Ленинградская обл.
668*	*holarctica*	1983	Молдавская ССР
45:an*	*holarctica*	Н/Д	Н/Д
989*	*holarctica*	1990	Украина, Хмельницкая обл.
M-48*	*holarctica*	1986	Астраханская обл.
M-80*	*holarctica*	1991	Татарская АССР

Продолжение таблицы1

Название штамма	*Подвид*	Дата выделения	Место выделения
M-157*	*holarctica*	Н/Д	Челябинская обл.
M-1354*	*holarctica*	1988	Астраханская обл..
74*	*holarctica*	1989	Московская обл..
84*	*holarctica*	1977	Московская обл.
A-408(217)*	*holarctica*	1978	Уральская обл.
I-288*	*holarctica*	1975	Сахалинская обл.
I-311*	*holarctica*	1972	Сахалинская обл.
I-346*	*holarctica*	1972	Бурятская АССР
1238*	*holarctica*	1977	Ростовская обл.
45*	*holarctica*	2004	Краснодарский край
C-52(7)*	*holarctica*	2000	Краснодарский край
96*	*holarctica*	2004	Краснодарский край
179*	*holarctica*	2002	Краснодарский край
M-24*	*holarctica*	1980	Куйбышевская обл.
623*	*holarctica*	1961	Краснодарский край
7 b/sample №816*	*holarctica*	1989	Краснодарский край
893*	*holarctica*	1959	Н/Д
X-1/23	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
X-1/25	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
X-10	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
X-2/26	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
X-3	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
X-3/23	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
X-3-2	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
X-4	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
X-7	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
X-7-2	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
X-8K	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
X-8M	*holarctica*	2013	Ханты-Мансийский АО
9	*holarctica*	1948	Московская обл.
503	*holarctica*	1949	Московская обл.
21/400	*holarctica*	1949	Московская обл.
I-282	*holarctica*	1971	Читинская обл.
Miura	*holarctica* bv. *japonica*	1975	Япония
Jasoe	*holarctica* bv. *japonica*	1974	Япония
Tsuchiya *	*holarctica* bv. *japonica*	Н/Д	Н/Д
117	*mediasiatica*	1960	Среднеазиатский НИПЧИ
120	*mediasiatica*	1968	Среднеазиатский НИПЧИ
554	*mediasiatica*	2011	Алтайский край
678	*mediasiatica*	2011	Алтайский край
823	*mediasiatica*	2011	Алтайский край
120 (113)*	*mediasiatica*	1965	Казахская ССР

Продолжение таблицы 1

Название штамма	*Подвид*	Дата выделения	Место выделения
150 (31)*	*mediasiatica*	1969	Казахская ССР
122*	*mediasiatica*	1973	Н/Д
А-122 (543)*	*mediasiatica*	1965	Казахская ССР
60 (Б-57)*	*mediasiatica*	1960	Каракалпакская АССР
112	*novicida*	1955	США, Юта
320	*novicida*	1972	США
D9876*	*novicida*-like	1977	США, Луизиана
8859	*tularensis*	1958	США
Schu	*tularensis*	1941	США
B 399	*tularensis*	1972	США
Nevada 14*	*tularensis*	1953	США
O-402*	*tularensis*	1964	США, Мэриленд
O-328*	*tularensis*	1935	Канада
F9693*	*F. philomiragia*	1986	США, Массачусетс

Примечание: * Штаммы, отмеченные звездочкой (*), представлены в коллекции лишь в виде препаратов хромосомной ДНК. Н/Д – нет данных.

Таблица 2 – Штаммы микроорганизмов, использованные для молекулярно-генетических работ

Название	Характеристика	Источник или ссылка
F. tularensis subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ	Вакцинный штамм	«ГКПМ-Оболенск»
F. tularensis subsp. tularensis Schu	Природный штамм	«ГКПМ-Оболенск»
F. tularensis subsp. holarctica 503	Природный штамм	«ГКПМ-Оболенск»
F. tularensis 15Δ*qseC*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *qseC*	НИ
*F. tularensis*15Δ*qseC*/pHV33-*qseC*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *qseC*	НИ
*F. tularensis*15Δ*qseC*/pHVT-*qseC*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *qseC*	НИ
F. tularensis 15Δ*purMCDN,*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *purMCDN*	НИ
F. tularensis 15*recA*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *recA*	НИ
F. tularensis 15*recD*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *recD*	НИ

Продолжение таблицы 2

Название	Характеристика	Источник или ссылка
F. tularensis 1515/23-1	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *iglC* (одной копией)	НИ
F. tularensis 1515/23-2	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *iglC* (две копии)	НИ
F. tularensis 15/iglC-1Δ*recA*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *iglC* (одной копией) и геном *recA*	НИ
F. tularensis 15Δ*bla1*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *bla1*	НИ
F. tularensis 15Δ*bla2*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *bla2*	НИ
F. tularensis 15Δ*bla3*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированным геном *bla3*	НИ
F. tularensis 15Δ*bla13*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированными генами *bla1* и *bla3*	НИ
F. tularensis 15Δ*bla123*	Производный вакцинного штамма 15 НИИЭГ с инактивированными генами *bla1*, *bla2* и *bla3*	НИ
F. tularensis subsp. *mediasiatica* 120Δ*pur*	Производный природного штамма 120 с инактивированным геном *pur*	«ГКПМ-Оболенск»
E. coli DH5α	F^{-} *supE44 ΔlacUl69* (φ801acZΔM15)*hsd*R17 ($r_k^-m_k^-$) *rec*A l 9 *end*AI *gyr*A96 *thi-I el*Al	«ГКПМ-Оболенск» [Sambrook, 1989]
Bacillus anthracis СТИ-1	Вакцинный штамм	«ГКПМ-Оболенск»
Yersinia pseudotuberculosis серотип O:3 83	Природный штамм	«ГКПМ-Оболенск»
Yersinia pestis subsp. *pestis bv.* orientalis EV	Вакцинный штамм	«ГКПМ-Оболенск»

*Примечание:** НИ – настоящее исследование.

Штаммы микроорганизмов, использованных для анализа *in silico*, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Перечень штаммов, использованных для анализа *in silico*

Штамм	Вид	Подвид	Номер аннотированного генома в базе данных NCBI*
LVS	*F. tularensis*	*holarctica*	NC_007880.1
OSU18	*F. tularensis*	*holarctica*	NC_008369.1
FSC200	*F. tularensis*	*holarctica*	NC_019551.1
FTNF002-00	*F. tularensis*	*holarctica*	NC_009749.1

Продолжение таблицы 3

Штамм	*Вид*	*Подвид*	Номер аннотированного генома в базе данных NCBI*
FSC147	*F. tularensis*	*mediasiatica*	NC_010677.1
SCHU S4	*F. tularensis*	*tularensis*	NC_006570.2
WY96-3418	*F. tularensis*	*tularensis*	NC_009257.1
FSC198	*F. tularensis*	*tularensis*	NC_008245.1
U112	*F. tularensis*	*novicida*	NC_008601.1
3523	*F. tularensis*	*novicida*	NC_017449.1
Fx1	*F. tularensis*	*novicida*	NC_017450.1
Toba 04	*F. noatunensis*	*orientalis*	NC_017909.1
ATCC 25017	*F. philomiragia*	*philomiragia*	NC_010336.1

*Примечание:** http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Francisella

Плазмиды и праймеры

Олигонуклеотидные праймеры и зонды, использующиеся в данной работе, были синтезированы биотехнологической компанией «Синтол» (г. Москва, Россия).

Последовательности праймеров, использованных в работе, и их целевое назначение приведены в таблицах 4-5.

Таблица 4 – Список использованных в работе плазмид

Название	Характеристика	Источник или ссылка
pGM5	Amp^r, Cm^r, *sacB*	НИ
pGM6	Amp^r, Cm^r, *sacB*	НИ

Таблица 5 – Праймеры, использованные для MLVA-типирования

Локус	Последовательность прямого праймера 5'→3'	Последовательность обратного праймера 5'→3'
Ft-M1	GAGCTGGTCAAGTTTATTTAAGTA	CAGGATTGCTTGAACATGATA
Ft-M2	TTTATGATAAGGATGATTTAAAACA AAATA	GCTTAAATCTCGCAATACCATGTAAT
Ft-M3	GTTTTCACGTCTTGTCTCCTATCA	CAAAAGCAACAGCAAAATTCACAAA
Ft-M4	AAAAGGGCGGGTTACTGAGG	GTATCAAATAGCGCAAAAATAACTG C
Ft-M5	TAGGCATGACAAACCCTGCTAT	CAGCTCGAACTCCGTCATAC
Ft-M6	TTTTGGGTTTTCTCTAAACATTTCTA	CAATTCAGCGAAACCCTATCTTA
Ft-M7	ATTGGGTGATTTGGATGGTTG	CAGCTCGAACTCCGTCATAC
Ft-M8	AGTAATCTAGCCAAGGTAATA	CAGCTCGAACTCCGTCATAC
Ft-M9	AAGGACCTATTTTTACATCAGT	CAGCTCGAACTCCGTCATAC
Ft-M10	GTTGGCGAACCTAAAATAATAGC	CAGCTCGAACTCCGTCATAC
Ft-M11	AAACCTACAATCAACATCTGACAAT	TTGTTATATTAACCTCATCAGTTCAA TTTA

Продолжение таблицы 5

Локус	Последовательность прямого праймера 5'→3'	Последовательность обратного праймера 5'→3'
Ft-M12	CGCTAGATGGTGCTGATACTATCTT	CCTGCTAGAAAACCCATATTTACAT
Ft-M13	TTTGCAACTACTAGGTGTGGAGAT	TTGATATTCCAAATGATCAAGTTTT
Ft-M14	ACCGCCATCTTTTCTATCATAAT	AACCTTAAGTGATAAATATAACCCAAAA
Ft-M15	GCATGGACATGAGTGTCTATGGCGTAGATC	GATAAAGGAATGTTTTAAATAATGTGATGTTTTGCATC
Ft-M16	AGGAAAGCATACCCAACATTATT	CCAAAGATCGCCGTGATT
Ft-M17	GCTATAGCAGTAAATGTAGGCTCAA	ACATATCGGTGGATCACTATCAA
Ft-M18	AACAGCCTTCAAACCACCTT	CATAAAATACAGCTTCAATAAACAATCTT
Ft-M19	TCCGGTTGGATAGGTGTTGGATT	AGGCGGAGATCTAGGAACCTTT
Ft-M20	GCATAACTTTTGAGACAATTGGTGCAGATGATC	GACCGCCAGTATATGCTTGACCTTGACTCC
Ft-M21	CCACAGCTAGCCAGACCAAAT	AGTTTGGCGCGAGCTTAAT
Ft-M22	GTCAAAATCTCAAGATGAGCAAATATTTGAATGGT	GGAGTTTTTTCTCGTCCGCTGTTAGTGATTT
Ft-M23	TGAGATGTGGAACTTTATAGGTTCAA	TGTAAACTAAAAGATAACTAATGGCAATTT
Ft-M24	ATACGGTCCTAATAATATTCCTGTCA	ATTCATTTATAGATGCCTTTGTTACC
Ft-M25	GTGGTCTTTTAAGCGTCTTAGCAAGCTCGAC	GGGTACCCATCCCATATGTAAGTACAAATGTAGC

Клеточная линия и первичная культура клеток экспериментальных животных

Линия мышиных макрофагоподобных клеток J744.A1 получена из Российской Коллекции Клеточных Культур, г. С.-Петергбург, Россия. Перитонеальные макрофаги морской свинки и мыши получали с помощью пятикратного промывания брюшной полости забуференным физиологическим раствором, содержащим 0,1 % глюкозы. Перитонеальные макрофаги мыши получали из пула клеток перитонеального экссудата мышей по общепринятой методике [90].

Среды и условия культивирования

Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37 ºС на плотной питательной среде FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ) и в жидкой питательной среде [29] с добавлением полимиксина В до концентрации 100 мг/л.

Штаммы *E. coli* культивировали при температуре 37 °С в жидкой и на плотной питательной среде LB (Himedia Laboratories Pvt. Limited, Индия) [347].

Стандартные суспензии клеток штаммов *F. tularensis* готовили в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) с использованием стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ НЦЭСМП).

При необходимости в среды добавляли: ампициллин – от 100 до 1000 мг/л, хлорамфеникол - до концентрации 10 мг/л. Суспензии клеток штаммов *F. tularensis* готовили в забуференном физиологическом растворе с использованием стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ НЦЭСМП).

Клеточную линию мышиных макрофагов J774.A1 культивировали в пластиковых флаконах для культур тканей (Corning Costar, США) в концентрации $2\text{-}9 \times 10^5$ клеток/мл в среде DMEM (HyClone, США) с добавлением 10 % инактивированной фетальной сыворотки теленка, 2 мМ L-глутамина и 0,2 % бикарбоната натрия при 37 °С и 5 % CO_2 в CO_2-инкубаторе (Sanyo, США).

Перитонеальные макрофаги морской свинки и мыши культивировали в 24- или 96- луночных планшетах для культур тканей (Corning Costar, США) в концентрации $2\text{-}9 \times 10^5$ клеток/мл в среде DMEM (HyClone, США) с добавлением 10 % инактивированной фетальной сыворотки теленка, 2 мМ L-глутамина и 0,2 % бикарбоната натрия при 37 °С и 5 % CO_2 в CO_2-инкубаторе (Sanyo, США).

Экспериментальные животные

В экспериментах с животными, одобренными комиссией по биоэтике ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, были использованы мыши инбредных линий BALB/c($H2^d$), C57Bl/6($H2^b$) (6-8 недель, масса 18-20 г),

аутбредные мыши Swiss Webster(6-8 недель, масса 20-24 г) и морские свинки (5-7 недель, вес 350-450 г). Животные получены из филиала института биоорганической химии питомника «Пущино» 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 [79.] и Директивой Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [15].

Мыши содержались по 5 штук в клетках типа «микроизолятор» общей площадью 484 см^2, морские свинки – по 3 штуки в клетках общей площадью 864 см^2, на подстиле из древесных опилок не хвойных пород. Мыши получали автоклавированный стандартный корм ПК – 120 экструдированный, морские свинки – КК – 122 (ООО «Лабораторкорм», Россия). Все животные имели свободный доступ к стерильной воде.

Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней до эксперимента, оценивая физиологическую, психологическую и метаболическую адаптацию. После адаптации животных размещали и маркировали в соответствии с условиями эксперимента и с учетом требований «Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных» [30]. Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-26 °С, относительная влажность воздуха 30-70 %, кратность воздухообмена в помещениях для содержания животных – 12 кратных объемов/час.

Уход и манипуляции с животными осуществляли сотрудники, имеющие профессиональную подготовку, соответствующую квалификацию и опыт. Эксперименты и эвтаназию животных осуществляли в соответствии с СП 1.3.2322-08 и СП 1.3.1285-03 по безопасности работы с микроорганизмами I - IV групп патогенности [86,87].

Манипуляции с животными проводили в специально изолированной комнате для заражений. Животных иммунизировали подкожно в паховую

область, используя для мышей иглы 23G, объем вводимого раствора 0,2 мл, морским свинкам – иглы 25G и объем 0,5 мл. Наблюдение и взвешивание проводили ежедневно в течение 14 дней

Молекулярно-биологические методы

Выделение нуклеиновых кислот

Хромосомную ДНК из бактерий выделяли с помощью набора реагентов GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich, США).

Плазмидную ДНК из *E. coli*. выделяли с помощью «набора реагентов для выделения плазмидной ДНК GeneJet™» производства MBI Fermentas (Литва).

Тотальную ДНК из смесей бактериальных культур и секционного материала павших от экспериментальных инфекций мышей выделяли с помощью «Комплекта реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-преп»» (ИнтерЛабСервис, Россия).

Очистку ДНК из агарозного геля проводили с помощью «набора реагентов для извлечения ДНК из агарозного геля GeneJet™» производства MBI Fermentas (Литва).

РНК *F. tularensis* выделяли с помощью «комплекта реагентов для выделения РНК из клинического материала «РИБО-золь-В»» (ИнтерЛабСервис, Россия) и «набора для выделения РНК iScript RT-qPCR» (Bio-Rad, США). Полученный препарат РНК дополнительно очищали от примесей РНК ДНКазой I, свободной от РНК-аз (MBI Fermentas, Литва).

Обратную транскрипцию проводили с помощью «набора реагентов «ОТ-1» для обратной транскрипции» (Синтол, Россия).

Рестрикционно-лигазные работы проводили с использованием наборов ферментов производства Fermentas (Литва).

Все манипуляции проводились согласно инструкциям производителей.

Трансформация плазмидной ДНК

Приготовление компетентных клеток *E. coli* и передачу рекомбинантных плазмид в *E. coli* осуществляли “кальциевым” методом трансформации согласно описанию [34].

Клетки *F. tularensis* трансформировали плазмидными ДНК методом электропорации. Клетки туляремийного микроба выращивали ночь на FT-агаре, затем культуру собирали и ресуспендировали в ЗФР, дважды осаждали центрифугированием, ресуспедируя осадок в 0,5 М сахарозе с добавлением 1 мМ ЭДТА, pH 7,5. до концентрации клеток 10^{10}–10^{11} КОЕ/мл. Плазмидную ДНК (5 мкл - 0.01–0.1 мкг) смешивали с 100 мкл суспензии бактерий и переносили в кювету для электропорации. Импульс электрического поля накладывали с помощью электропоратора Bio-Rad Gene Pulser II (параметры: напряжение 2.5 кВ; емкость конденсатора 25 мкF; сопротивление 600 Ом). После электропорации суспензию бактерий вносили в пробирку с 1 мл питательной среды, инкубировали при 37 ºС в течение 2 ч и высевали на чашки с FT-агаром, содержащим соответствующий антибиотик для селекции плазмидосодержащих клонов. Учет клонов проводили через 2–4 дня инкубирования чашек при 37 ºС.

Полимеразная цепная реакция

Реакции амплификации фрагментов ДНК проводили с использованием термоциклера Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия). Реакционная смесь для ПЦР содержала буфер для ДНК-полимеразы, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров, 0,2 мкМ каждого дНТФ и 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы, 50-100 нг ДНК.

Продукты реакции разделяли электрофорезом в 0,7 -1,8 % агарозном геле («Sigma» США) в ТАЕ-буфере (Трис-ацетат 0,04 М, ЭДТА 0,002 М, pH 8,0), с последующим окрашиванием бромистым этидием (100 мг/л) [11] и детекцией с использованием трансиллюминатора ECX-15.L при длине волны 365 нм (Vilber Lourmat, Франция).

Электрофорез VNTR-ампликонов осуществляли в 3 %-ном агарозном геле. Горизонтальный электрофорез проводили в камере A3-1 Gator™ (Owl Separation Systems, Великобритания) в 0,5 × TBE буфере (0,045 мМ Трис-борная кислота, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0) при напряженности электрического поля 5 В/см. Время проведения электрофореза устанавливали эмпирически по длине

пробега лидирующего красителя бромфенолового синего. В соответствии с размером полученного ПЦР-продукта (длиной VNTR локуса) величина пробега могла составлять от 10 см до 40 см.

После окончания электрофореза гель окрашивали в течение 10 мин в растворе бромистого этидия (5 мг/л) при активном покачивании на шейкере. После окрашивания гель отмывали в течение 10 мин в дистиллированной воде, также при активном покачивании на шейкере. Отмытый гель фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм при помощи системы гель-документации Doc-Print (Vilber Lourmat, Франция). Расчет размера ампликона проводили с использованием программы PhotoCaptMw (Vilber Lourmat, Франция) по подвижности ампликона в геле относительно молекулярных маркеров (BIO-RAD, США).

Очистка ПЦР-продуктов и их секвенирование проводились в компании «Синтол» (г. Москва, Россия) (http://www.syntol.ru/).

ПЦР в реальном времени

Для дифференциации подвидов туляремийного микроба и анализа транскрипционной активности генов бета-лактамаз применяли метод ПЦР в реальном времени с использованием амплификатора с оптическим ПЦР-модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) с использованием «2,5 кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I» и «2,5 кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ» (Синтол, Россия, Москва). Детекцию продуктов амплификации проводили с использованием оптического ПЦР-модуля по каналам FAM/SYBR, HEX, ROX, Cy5.

Определение устойчивости к антибиотикам

Диско-диффузионный метод

Из суточной агаровой культуры *F. tularensis* готовили миллиардную микробную взвесь в забуференном физиологическом растворе с использованием стандарта мутности ОСО, 1 мл взвеси наносили на поверхность чашек с подсушенным FT-агаром, посредством покачивания

чашки культуру равномерно распределяли по поверхности среды с последующим отсасыванием избытка жидкости пипеткой. Засеянные чашки 5-10 мин подсушивали, затем на поверхность среды накладывали стандартные диски с антибиотиками с антибиотиками (OXOID). Диски располагали на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии и 2-2,5 см от края чашки. Через 24 часа измеряли зоны торможения роста бактериальной культуры вокруг соответствующих дисков с антибиотиками.

Метод серийных разведений

Для проведения теста в 96-луночных полипропиленовых микропланшетах готовили двукратные разведения антибиотиков в объеме 100 мкл. Антибиотики использовали в концентрациях от 2 до 10 000 мг/л.

Взвесь микроорганизмов для исследования готовили из суточной агаровой культуры *F. tularensis* на забуференном физиологическом растворе по стандарту мутности в концентрации 5×10^9 м.к./мл и разводили в 25 раз жидкой питательной средой для туляремийного микроба до концентрации 2×10^8 м.к./мл. Затем в каждую лунку приготовленных планшетов с разведениями антибиотиков добавляли по 100 мкл бактериальной суспензии. Таким образом, конечная концентрация микробных клеток составляла 1×10^8 м.к./мл, а конечные концентрации ампициллина - от 1 до 5000 мг/л. Микропланшеты инкубировали при температуре 37 ºС в течение 24 часов для роста культуры *F. tularensis.*

Чувствительность к антибиотикам мутантных и исходного штамма сравнивали по степени бактерицидного эффекта после инкубации клеток туляремийного микроба в присутствии антибиотика. Для этого мы использовали колориметрический тест МТТ, основанный на способности мембранных дегидрогеназ восстанавливать желтую соль МТТ (3-(4,5-диметитиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) до синего формазана. Данная реакция происходит только в живых клетках с активными ферментами. Степень синей окраски в лунке коррелирует с количеством живых туляремийных клеток.

После 24 часовой инкубации во все лунки 96-луночного планшета добавляли по 10 мкл раствора МТТ в забуференном физиологическом растворе (5 мг/мл) и дополнительно инкубировали в течение 4 ч при температуре 37 °С, затем содержимое лунок растворяли добавлением 50 мкл 10%- ного раствора додецилсульфата натрия, приготовленном на 0,01 М соляной кислоте, и измеряли оптическую плотность полученного лизата при длине волны 595 на многоканальном спектрофотометре (Пикон, Россия). Бактерицидный эффект рассчитывали как процент живых клеток в лунках с антибиотиком, по сравнению с контрольными лунками без антибиотика: процент живых клеток = $OD595_{аб}$ / $OD595_{контроль}$ ×100.

Определение β-лактамазной активности

β-лактамазную активность определяли в реакции с нитроцефином (500 мг/л) в жидкой среде по изменению окраски. Регистрировали изменение оптической плотности при длине волны 495 нм.

Штаммы *F. tularensis* растили ночь в жидкой питательной среде, половину проб выращивали в присутствии ампициллина (200 мг/л). Через 24 часа половину объема каждой пробы отбирали отдельно и готовили осветленные ультразвуковые лизаты.

Затем жидкую питательную среду с нитроцефином (500 мг/л) вносили в 96-луночный планшет по 100 мкл, добавляли в каждую лунку по 100 мкл культуры *F. tularensis* или осветленного лизата, ставили планшет в термостатируемую ячейку планшетного спектофотометра при температуре 37 °С и немедленно измеряли оптическую плотность (абсорбцию) при 495 нм. Затем проводили измерение оптической плотности каждый час в течение суток.

Методы исследования животных

Оценка изменения веса и температуры животных

Взвешивание животных проводили на электронных весах Scout ProSPU, («Ohaus", США) с точностью измерения 0,1 г. Морских свинок взвешивали индивидуально и определяли процентное изменение среднего веса в группе по

отношению к весу в день заражения. Мышей взвешивали группой по 5 животных в специальном лотке для взвешивания в одно и то же время суток, затем рассчитывали процентное изменение среднего веса мышей в группе.

Температуру измеряли в одно и то же время суток при постоянной температуре помещения и одинаковой влажности с помощью чипов для термометрии Implantable Electronic ID Transponders («BMDS», США), которые вводили подкожно за сутки до заражения, и сканирующего устройства Pocket scanner («BMDS», США).

Определение гематологических показателей крови и уровня цитокинов

Общий анализ крови животных проводили с помощью автоматического гематологического анализатора для ветеринарии PCE90Vet («High Technology», США). Уровень цитокинов ФНО-альфа и гамма-интерферона в сыворотке крови мышей оценивали иммуноферментным методом, используя наборы фирмы eBioScience (Австрия) согласно инструкции.

Забор крови у животных проводили на 4, 7, 11 и 21 сутки после иммунизации, подвергая анестезии с помощью CO_2. Животных накануне эксперимента лишали корма, оставляя свободным доступ к воде. Для определения форменных элементов крови с дифференциацией лейкоцитов использовали рекомендованные к гематологическому анализатору микропробирки с антикоагулянтом K_2-ЭДТА («Labor Diagnostik Systeme», Германия). Для определения уровня цитокинов в сыворотке полученные образцы крови оставляли при комнатной температуре на 15 мин, затем тонкой палочкой отделяли сгусток от стенок пробирки и центрифугировали в течение 10-15 мин при 3000 об/мин. Сразу после центрифугирования сыворотку отбирали, делили ее на аликвоты и хранили при – 20 °С до выполнения анализа.

Определение титра антител в сыворотке крови

Определение титра антител проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) согласно руководству [363].

В качестве антигена использовали УЗД *F. tularensis* (концентрация суспензии – 1×10^8 м.к./мл), который адсорбировали на пластик в 96-луночных

планшетах фирмы Greiner Bio-One (Германия) средней сорбции в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6 в течение ночи при температуре 4 °С. Исследуемые сыворотки крови предварительно разводили в 50 раз и титровали с шагом 1:2 и инкубировали с антигеном в течение 1 ч при температуре 37 °С. После удаления сыворотки и трехкратной отмывки PBS в лунки вносили раствор коньюгата козьих поливалентных антител к иммуноглобулинам мыши (IgG, IgA, IgM) - пероксидаза хрена (Amersham, США) в рабочем разведении 1:10000 или кроличьих антимышиных поливалентных антител к иммуноглобулину G морской свинки (Sigma, США) в рабочем разведении 1:20000 и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С.

Ферментативную реакцию проводили с использованием в качестве хромогена *о*-фенилендиамина (ОФД) (4 мг/мл). Планшет инкубировали в течение 20 мин в темноте и реакцию останавливали внесением 0,1 мл 0,1 М соляной кислоты. Оптическую плотность (ОД) в лунках измеряли при длине волны 492 нм. За титр антител принимали максимальное разведение сыворотки, в которой ОД хромогена превышало двойное значение фоновой оптической плотности.

Определение уровня синтеза интерферона лимфоцитами иммунизированных мышей

В качестве источника Т-лимфоцитов использовали суспензию спленоцитов мышей. Мышей эвтаназировали ингаляцией CO_2, затем стерильно вскрывали брюшную полость и изолировали селезенку. Селезенку стерильно гомогенизировали через капроновый фильтр в среду RPMI-1640, дважды центрифугировали полученную суспензию спленоцитов при 250 g по 10 мин, ресуспендировали в полной питательной среде на основе RPMI-1640(10 % ФС, 2мМ глутамина, 5 мМ меркаптоэтанола, 20 мкМ Hepes), до конечной концентрации 5×10^6 клеток/мл. Для оценки специфического клеточного ответа к спеленоцитам в среду культивирования вносили суммарный туляремийный антиген – ультразвуковой лизат *F. tularensis* 10^8 КОЕ. Митоген конканавалин А

(Sigma) в концентрации 5 мкг/мл применяли в качестве положительного контроля. Спленоциты культивировали при 37° С, 5 % CO_2 и 100 % влажности в течение 72 ч, отбирали супернатант и определяли в нем уровень синтеза гамма-интерферона иммуноферментным методом, используя наборы фирмы eBioScience (Австрия) согласно инструкции.

Методы исследования биологических свойств потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis* с делециями генов

Оценка культурально-морфологических свойств штаммов F. tularensis

Для изучения морфологии колоний штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37 ºС на плотной питательной среде FT-агаре с черным альбумином (ФБУН ГНЦ ПМБ). Готовили стандартные суспензии в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) с использованием стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ НЦЭСМП), высевали на плотную питательную среду и культивировали в течение 2-5 дней, оценивая скорость роста и морфологию колоний. Из отдельных колоний каждого из исследуемых штаммов готовили мазки, окрашивали по Граму и оценивали морфологию бактериальных клеток каждого штамма.

Размножение штаммов F. tularensis в макрофагах

Клетки перитонеального экссудата мышей помещали в культуральную среду (среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с добавлением 10 % инактивированной фетальной сыворотки теленка и 2 мМ глутамина) в конечной концентрации 2-5×10^5 кл/мл и высевали в 24-луночные планшеты для культур тканей (Corning Costar, США) по 1 мл в лунку. Затем клетки инкубировали при 5 % CO_2 и температуре 37 °С в течение 18-24 ч для кондиционирования и адгезии макрофагов к пластиковой подложке

Мышиные макрофагоподобные клетки линии J774.A1 обрабатывали раствором трипсин/ЭДТА (1:4) для отлипания клеток от подложки, затем клетки смывали с пластиковой поверхности флакона средой DMEM с добавлением 10 % инактивированной фетальной сыворотки теленка и 2 мМ глутамина и в концентрации 2-5 × 10^5 кл/мл помещали в 24-луночные планшеты

для культур тканей по 1 мл в лунку. Клетки инкубировали при 5 % CO_2 и температуре 37 °С в течение 18-24 ч для кондиционирования и формирования монослоя не менее 70% от всей поверхности лунки.

Через сутки клеточный монослой клеток J774.A1 или перитонеальных макрофагов отмывали свежей культуральной средой и вносили в лунки бактериальную взвесь *F. tularensis* в среде DMEM из расчета 100 бактериальных клеток на 1 макрофаг, инкубировали при 37 °С и 5 % содержании углекислого газа в течение 3 ч, затем для уничтожения внеклеточных бактерий обрабатывали в течение 1 часа гентамицином (10 мг/л), обладающим бактерицидным действием в отношении *F. tularensis*, но не проникающим в макрофаги. После трехкратного отмывания от антибиотика клеточный монослой в части лунок лизировали дистиллированной водой и делали высевы десятикратных разведений лизата на чашки с FT-агаром. Макрофаги в остальных лунках продолжали культивировать в среде DMEM с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка до 24 или 48 ч при 37 °С и 5 % углекислого газа, после чего также лизировали дистиллированной водой и делали высевы на чашки с FT-агаром. Через 2-3 суток подсчитывали количество КОЕ. Эффективность размножения оценивали по разнице между десятичными логарифмами КОЕ, полученными из высева лизатов макрофагов через 3 и через 48 ч после инфицирования.

Определение устойчивости штаммов F. tularensis к нормальной кроличьей сыворотке

Для приготовления нормальной кроличьей сыворотки из краевой вены уха здорового неиммунизированного кролика забирали 5 мл крови в пробирку, не допуская при этом вспенивания. Собранную кровь инкубировали при 37 °С в течение часа, сыворотку отбирали, центрифугировали в микроцентрифуге, разделяли на аликвоты и хранили при − 18 °С до использования.

Из свежей агаровой культуры готовили по стандарту мутности суспензию клеток в забуференном физиологическом растворе, pH 7,2. Контроль концентрации клеток проводили методом высева из соответствующих

разведений на FT-агар, содержащий 100 мг/л Pm. Микробные клетки вносили в неразведенную сыворотку до концентрации 2×10^6 КОЕ мл$^{-1}$ (1/10 часть клеточной суспензии от конечного объема) и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Концентрацию выживших клеток определяли высевом из исходной клеточной суспезии и первого, второго и третьего десятикратных разведений на среду FT-агар, содержащую 100 мг/л Pm.

Определение остаточной вирулентности штаммов F. tularensis на мышиной модели

Определение вирулентности штаммов *F. tularensis* проводили на модели мышей линии BALB/c и морских свинках. Определение LD_{50}, а также доверительных интервалов (для вероятности 95 %) проводили согласно методу Кербера в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1], используя для расчетов формулу:

$$\lg LD_{50} = D_N - \lg\delta(\sum Li - 0{,}5)$$

LD_{50} = anti lg LD_{50}

где $\lg D_N$ – логарифм максимальной заражающей дозы;

$\lg\delta$ – логарифм кратности разведения (отношения каждой последующей дозы к предыдущей);

Li- отношение числа животных, погибших от введения данной дозы, к общему числу животных, которым эта доза была введена;

$\sum Li$ – сумма значений Li, вычисленных для всех испытанных доз.

Заражение лабораторных животных выполняли в виварии, соответствующем требованиям GAC (Good Animal Care) и протоколу № P03-20 комитета по биоэтике ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии. Для определения остаточной вирулентности на модели морских свинок использовали животных массой 400 - 500 г. Животным (по 5 в группе) подкожно в правую паховую область вводили взвесь бактериальных клеток

исходного или мутантных штаммов *F. tularensis*. в объеме 0,5 мл в дозах 5 x 10^3, 5 x 10^5, 5 x 10^7 и 5 x 10^9 м.к./морскую свинку.

Для определения остаточной вирулентности на мышах линии BALB/c использовали 5-8-недельных мышей обоего пола (весом 18-20 г) по 5 животных в группе. Мышам подкожно вводили взвесь бактериальных клеток исходного или мутантных штаммов *F. tularensis*. в объеме 0,2 мл в дозе от 1 x 10^1до 1 x 10^8 м.к. /мышь (дозы определяли по отраслевому стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П соответствующего года выпуска). Погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. За оставшимися в живых животными наблюдали в течение 28 дней. Для подсчета LD_{50} и расчета вводимых доз делали высевы культур всех штаммов из 7 разведения по 0,1 мл на 3 чашки с FTA.

Определение уровня обсемененности органов лабораторных животных при заражении

Экспериментальных животных инфицировали подкожно штаммами *F. tularensis* в дозе 10^2 КОЕ/мышь. На 4, 7, 14 и 21 сутки проводили эвтаназию животных ингаляцией CO_2 и некропсию селезенок. Органы взвешивали и гомогенизировали, а затем десятикратные разведения гомогенатов высевали на FT-агар. Расчет обсемененности проводился на 1 мг веса органа.

Оценка протективности штаммов F. tularensis на мышиной модели

Мышей линии BALB/c иммунизировали исследуемыми штаммами *F. tularensis* подкожно в область верхней трети правого бедра в дозах 10^2, 10^3, 10^4 и 10^5 м.к./мышь. На 28-е сутки после иммунизации проводили заражение животных вирулентным штаммом *F. tularensis* 503 подкожно в область верхней трети левого бедра дозой 1000 DCL.

Определение протективной активности штамма *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA *F. tularensis* проводили дополнительно на морских свинках. Морских свинок иммунизировали дозами от 5 до 5 × 10^4 м.к/морскую свинку в объёме 0,5 мл физиологического раствора. На 28-е сутки после иммунизации проводили

подкожное заражение животных вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 и Schu в дозе 1000 DCL.

Для расчета фактически вводимых доз делали высевы культур всех штаммов из седьмого разведения по 0,1 мл на 3 чашки с FTA.

Животные после заражения находились под наблюдением в течение 30 дней.

Погибших животных регистрировали и вскрывали общепринятым методом, а органы и ткани (селезенку, печень, лимфатический узел из места введения, кровь) подвергали бактериологическому исследованию, высевая их методом отпечатков на FT-агар. Учет результатов посевов проводили через 3-7 суток.

Мышей и морских свинок с типичными для туляремии изменениями и выделением культуры туляремийного микроба считали погибшими от туляремии. Животных, погибших от неспецифических причин, исключали из числа взятых в опыт.

Величину LD_{50} испытуемого и контрольного вакцинных штаммов вычисляли по методу Кербера, как описано в предыдущем разделе.

Проведение патоморфологических исследований

Для гистологических исследований кусочки органов животных (регионарные лимфатические узлы, селезенка, печень, легкое, почка, тонкий и толстый кишечник) фиксировали в 10 %–ном водном нейтральном растворе формалина при комнатной температуре, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин [38]. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали раствором гематоксилин-эозина [31]. Препараты микроскопировали под иммерсией в проходящем свете.

Методы статистической обработки результатов

Каждую пробу в экспериментах исследовали в трех повторах, эксперименты повторяли, по меньшей мере, дважды. Результаты экспериментов были представлены как средняя величина ± 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 менее чем 0,05 считали статистически значимыми.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности результатов работы свидетельствует использование современных адекватных методов исследования, которые характеризуются высокой чувствительностью, объективностью, а также поддерживаются программным обеспечением, позволяющим проводить статистический анализ полученных данных. Использование указанных методов позволило разработать новый системный подход, направленный на совершенствование генодиагностики, проводить направленный мутагенез для установления генетических детерминант, определяющих патогенные и иммуногенные свойства туляремийного микроба, а также получать аттенуированные штаммы с заданными свойствами.

Диссертация апробирована на межлабораторной научной конференции ФБУН ГНЦ ПМБ (протокол № 45 от 22 декабря 2015 г.).

Материалы диссертации доложены и представлены на 17 международных и 19 российских научных конференциях: Second International Conference on Tularemia (Hradec Kralove, Czech Republic, 1997); 3rd International Conference on Anthrax (University of Plymouth, 1998); Международной конференции «Проблемы медицинской и экологической биотехнологии» (Оболенск, 1999 г.); International Workshop Meeting “Problems of Biological and Ecological Safety” (Obolensk, 2000); Third International Conference On Tularemia (Umea, Sweden, 2000); Fourth International Conference On Tularemia (City of Bath, Great Britain, 2003); Третьем Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2005); Юбилейной научной конференции, посвященной 75-летию НИИ микробиологии МО РФ (Киров, 2003); 1st International Conference on Enviromental, Industrial and Applied

Microbiology “BioMicroWorld-2005” (Badajoz, Spain, 2005); VI Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ (Волгоград, 2005); Niaid Research Conference (Opatija, Croatia, 2006); VII-й Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ (Оболенск, 2006); 5th International Conference on Tularemia (Marine Biological Labs, Woods Hole, MA, USA, 2006); Научно-практической конференции «Современные аспекты эпидемиологического надзора за особо опасными инфекционными заболеваниями на юге России» (Ставрополь, 2007); VIII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями в государствах-участниках СНГ» (Саратов, 2007); VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика -2007» (Москва, 2007); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вакцинология – 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики и лечения инфекционных болезней» (Москва, 2008); Научно-практической школе-конференции молодых ученых и специалистов НИО Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболенск, 2010); Третьем съезде военных врачей медико-профилактического профиля вооруженных сил Российской Федерации «Достижения науки и практики в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия вооруженных сил Российской Федерации» (Санкт-Петербург, 2010); III научно-практической школе-конференции молодых ученых и специалистов НИО Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболенск, 2011); 5th Baltic Meeting “Microbial Carbohydrates” (Suzdal, 2012); IV Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2012); Научно-практической конференции Роспотребнадзора «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения» (Нижний Новгород, 2012); 7-th International Conference on Tularemia

(Beaver Run Resort, Brekenridge, Colorado, USA, 2012); First International Conference “Infection Diseases and Nanomedicine” – 2012” (Kathmandu, Nepal, 2012); 2-й ежегодной научно-практической конференции «Наука о лабораторных животных: современные подходы» (Санкт-Петербург, 2012); V Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2013); Международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2013); Симпозиуме «Разработка новых противотуберкулезных вакцин: позитивные и проблемные аспекты» в рамках II Конгресса национальной ассоциации фтизиатров «Современные направления развития фтизиатрии: научные разработки и практический опыт борьбы с туберкулезом» (С.-Петербург, 2013); Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения» (Нижний Новгород, 2014); VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (Ставрополь, 2014); International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (Vienna, Austria, 2014); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (Москва, 2014); Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств – членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционным болезней» (Сочи, 2015); Международной конференции «Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней» (Москва, 2015); 8th International Conference on Tularemia (Opatija, Croatia, 2015).

Личное участие автора в получении результатов

Участие автора заключалось в выборе темы диссертации, планировании научной работы, формулировке целей и задач, обосновании дизайна исследования, в непосредственном проведении экспериментов, анализе и систематизации полученных результатов, написании и оформлении рукописи

диссертации и основных публикаций по выполненной работе. Диссертация представляет собой системное обобщение статистически обработанных данных, полученных лично автором.

В исследованиях также принимали участие сотрудники ФБУН ГНЦ ПМБ: д.б.н. В.М. Павлов, к.б.н. В.С. Тимофеев, к.б.н. Т.И. Комбарова, к.б.н. А.А. Лапин, к.м.н. Г.М. Титарева, Г.М. Вахрамеева, к.м.н. И.В. Бахтеева, Р.И. Миронова, к.б.н. Т.Б. Кравченко, к.б.н. Т. Ю. Кудрявцева. Всем им автор выражает глубокую благодарность.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработан комплексный подход идентификации возбудителя туляремии методами генодиагностики, состоящий из трех этапов его исследования. С помощью созданной тест-системы «MULTI-FLU», в основе которой лежит применение метода мультилокусной ПЦР в реальном времени, выявляется вид возбудителя (среди трех наиболее особо опасных бактериальных инфекций – чумы, сибирской язвы и туляремии). Сконструированный уникальный праймер, содержащий Chi-последовательность *E. coli*, позволяет проводить внутривидовую дифференциацию *F. tularensis*. Минимизированный набор из 17 локусов для метода MLVA-типирования (Ft-M2 − Ft-M8, Ft-M10, Ft-M12, Ft-M13, Ft-M17, Ft-M18, Ft-M20, Ft-M21, Ft-M22, Ft-M24, Ft-M25) позволяет идентифицировать индивидуальный генотип штаммов, выделяемых на территории бывшего Советского Союза.
2. На территории Российской Федерации в Южной Сибири (Алтайский край) циркулирует эндемичная генетически обособленная популяция *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*; ранее штаммы этого подвида выделялись только на территории Средней Азии. Сниженная β-лактамазная активность *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* связана со значительным снижением скорости гидролиза антибиотиков у штаммов этого подвида по сравнению со штаммами других подвидов.
3. Созданные суицидные векторы pGM5 и pGM6 позволили повысить эффективность аллельного обмена в туляремийном микробе и разработать

панель штаммов с инактивированными генами, изучение иммунобиологических свойств которых обусловило выбор генов-мишеней для создания кандидатной вакцины с улучшенными свойствами. Целенаправленная инактивация одной копии гена *iglC* и гена *recA* вакцинного штамма позволила получить штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, обладающий сниженной реактогенностью и стабильностью биологических свойств при сохранении иммуногенности и протективности на уровне исходного вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

4. Упрощенный алгоритм отбора потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis* позволяет повысить научную и экономическую эффективность выбора вновь создаваемых штаммов за счет использования мышиной модели экспериментальной туляремии, а также модели *in vitro* на линиях мышиных макрофагов в качестве альтернативы лабораторным животным.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 82 научные работы, в том числе 22 статьи в рецензируемых изданиях, 60 – в материалах конференций, одно руководство, 5 патентов на изобретения РФ.

Структура и объем диссертации

Основной текст диссертации изложен на 372 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований с обсуждениями полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 97 работ отечественных и 397 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 63 рисунками и 53 таблицами и включает два приложения.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения о туляремийной инфекции

Туляремия – особо опасная инфекция, являющаяся природно-очаговым зоонозом. Этиологический возбудитель этой инфекции – грам-отрицательная коккобацилла - *Francisella tularensis* [55]. В соответствии с Международной статистической классификацией болезней [37] выделяют следующие клинические формы туляремии: ульцерогландулярная туляремия (по старой классификации – язвенно-бубонная), окулогландулярная туляремия (глазо-бубонная); торакальная (легочная туляремия); абдоминальная (желудочно-кишечная туляремия); генерализованная туляремия. Абдоминальная, торакальная и генерализованная формы являются наиболее опасными для людей с долей летальных случаев у пациентов без надлежащего лечения до 30 % [175].

Свое название туляремия получила по имени находящейся в Калифорнии (США) местности Туляре («волчья трава»), населенной большим количеством разнообразных грызунов. В 1910 г. экспедиция, работавшая под руководством G.W McCoy с участием C.W. Chapin, выявила среди земляных белок и других грызунов эпизоотию чумоподобных заболеваний, при которых возникали бубоны, очень напоминавшие чумные. Исследователи смогли искусственно передавать заболевания от больных животных здоровым, но чумного микроба при этом обнаружить не удалось [55]. В 1912 г. они выделили от больных сусликов культуру возбудителя. Впервые полное описание данного возбудителя дал Эдвард Фрэнсис (Edward Francis) [216], в честь которого был назван род бактерий, к которому относится возбудитель туляремии [55].

Бактерии *F. tularensis* – грамотрицательные коккобацилы (0,1-0,5 мкм) окруженные капсулой толщиной 0,06 мкм – 0,12 мкм, спор не образуют и не имеют жгутиков [55, 175]. На плотных питательных средах возбудитель туляремии формирует круглые мелкоточечные белесоватые колонии с ровными краями. Туляремийный микроб – аэроб, не растущий на обычных питательных средах (мясо-пептонный агар и бульон). Обязательными

компонентами питательных сред для культивирования туляремийного микроба являются цистеин, тиамин, глюкоза, а также дефибринированная кровь (до 10 %) или сыворотка (10 %) [55]. Оптимальная температура культивирования 37-38°С, pH среды 6,8-7,4.

Для выращивания культуры *F. tularensis* используют также синтетические питательные среды, в которые включают не менее 13 аминокислот [356]. В настоящее время широко применяется синтетическая среда Чемберлена, оптимизированная по содержанию аминокислот, витаминов и ионов железа [139], а также сложные жидкие питательные среды, содержащие гидролизаты белков животного происхождения – бульон Мюллера-Хинтона, сердечна-мозговая вытяжка и триптиказо-соевый бульон [309, 465], Т-бульон, содержащий сердечно-мозговой экстракт, триптон и кислотный гидролизат казеина [72], простая жидкая питательная среда для наработки биомассы туляремийного микроба с целью выделения ДНК и антигенов из бактериальных клеток и культивирования трансформантов *F. tularensis* [28]. В России и странах СНГ в последние годы для культивирования *F. tularensis* используют FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, МО).

Для размножения бактерии *F. tularensis* нуждаются в кислороде, поэтому они обладают ROI-инактивирующими ферментами, такими, как супероксиддисмутазы СОДы, пероксидазы и каталазы [97, 305].

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 О-полисахарида (О-антигена), присоединенного к липиду А через олигосахарид кора, и капсульный полисахарид [470]. ЛПС *F. tularensis*, в отличие от ЛПС других патогенных бактерий, не токсичен и не индуцирует провоспалительные цитокины [105]. Делеция части или всего О-полисахарида ЛПС *F. tularensis* приводит к утрате устойчивости бактерий к действию нормальной кроличьей сыворотки (НКС) и потере вирулентности штаммом, дефектным по ЛПС [71, 45, 218].

Возбудитель туляремии является внутриклеточным паразитом, способным инфицировать макрофаги [450], выживать в непрофесиональных клетках млекопитающих, таких, как гепатоциты, фибробласты, клетки эндотелия и эпителия [410], а также персистировать в простейших [99, 246]. Бактерии *F. tularensis* – одни из немногих патогенов, которые могут выживать в нейтрофилах [340].

1.2 Эпидемиология туляремии

Первое упоминание о туляремийной инфекции относится к 1818 г. на острове Хонсю (Япония) как о заболевании "ято-био". В Норвегии в 1896 г. возбудитель туляремии был выделен от леммингов [256]. В 1877 г. в России под Астраханью была выявлена вспышка заболевания, которое ретроспективно оценивается как туляремия.

После выделения культуры возбудителя от больных сусликов и его полного описания Эдвардом Фрэнсисом в 1912 г [216], были зарегистрированы первые случаи заболевания, вызываемого этим возбудителем у людей, которые были описаны W.B. Wherry and B.H. Lamb в 1914 [254.]. В следующее десятилетие о заболеваниях с похожими симптомами под разными названиями было сообщено из различных регионов Соединенных Штатов. В своем обзоре в 1921 г. Эдвард Фрэнсис предположил, что эта болезнь передается человеку от грызунов через укусы кровососущих насекомых [214].

После этих пионерских работ стали появляться многочисленные отчеты по туляремии и к 1929 г. в США было зарегистрировано более 800 случаев, к 1945 году их насчитывалось более 14000, пик заболеваемости был зарегистрирован в 1939 г. - 2291 случай [269]. В последующем стало очевидно, что возбудитель туляремии распространен не только в Северной Америке, но и в других регионах земного шара. В 1920 г. исследователи сообщили о болезни с похожими симптомами в Японии и России.

К настоящему времени практически во всех странах северного полушария (кроме Англии и Исландии) в ареале между 30 и 70° с.ш. существуют эндемичные районы этого возбудителя. Наибольшее распространение этой

инфекции отмечается в Чехословакии, Австрии, Германии, Франции, Польше, Косово, Финляндии и Швеции [191, 399, 449]. Недавно появились сообщения о случаях туляремии в Испании [106, 383]. Ежегодно случаи заболевания туляремией регистрируются в Японии и Северном Китае. В Западном полушарии каждый год заболевание туляремией регистрируются в Соединенных Штатах и Канаде, а так же небольшое число случаев зарегистрировано в Мексике. В среднем с 1990 по 2000 г.г. ежегодно регистрировалось по 120 случаев заболевания туляремией в США [250]. Более половины из этих случаев приходятся на Арканзас, Миссури, Южную Дакоту и Оклахому. Следует отметить, что не было зарегистрировано случаев заболевания людей туляремией в Южном полушарии.

Несмотря на накопление знаний в области эпидемиологии туляремии, в первое десятилетие после открытия возбудителя при описании жизненного цикла, обеспечивающего его сохранение в природных очагах, возникали определенные трудности, которые актуальны и до настоящего времени. Во-первых, очаги туляремии достаточно локализованы и охватывают не более сотен квадратных километров, в то время как на соседних участках отмечается очень низкая заболеваемость. Во-вторых, большинство эпидемиологических исследований основаны на предположении о корреляции сохранения патогена в результате вспышек заболевания среди грызунов. Однако, по-видимому, *F. tularensis* может сохраняться в окружающей среде без сопутствующих вспышек туляремии. Для возникновения эпизоотий, обеспечивающих активный инфекционный цикл, необходимы определенные климатические условия [370], при которых происходит увеличение количества зараженных бактериями насекомых-переносчиков – клещей, мух, слепней и комаров, что приводит к случаем туляремии среди животных и людей. Периодически резкое возрастание численности грызунов (через каждые 3–4 года) так же приводит к возникновению обширных разлитых эпизоотий этой инфекции. В межэпизоотическом периоде процесс протекает в локальных микроочагах в местах концентрации грызунов.

Представление о туляремии, как типичном зоонозном заболевании со свойственными ему источниками инфекции (мелкими млекопитающими, высоковосприимчивыми и высокочувствительными к возбудителю), переносчиками (иксодовыми клещами и другими кровососущими членистоногими) и путями передачи, не всегда находит объяснение данным, полученным в последнее время при эпизоотологическом обследовании различных территорий [19, 60, 106]. Считается, что туляремийный микроб является факультативным внутриклеточным паразитом теплокровных животных, однако частое выделение из окружающей среды, особенно из различных водных объектов [21, 42, 84, 99] связано, возможно, со способностью инфицировать и переживать в простейших, например, амебах [99, 119, 189, 456]. Гидрофильность возбудителя туляремии голарктического подвида проявляется приуроченностью природных очагов туляремии к водным биоценозам, частым и продолжительным обнаружением микроба и его антигенов в составляющих водных экосистемах [127, 377]. Значение среды природных водоемов и обитающих в них водных беспозвоночных в экологии туляремийного микроба остается малоизученным.

В одном из недавних исследований для изучения роли комара, как потенциального вектора в жизненном цикле *F. tularensis* subsp. *holarctica,* были исследованы личинки комара Aedes aegypti, находящиеся в водной среде, содержащей 10^7 м.к./мл вирулентного штамма туляремийного микроба [457]. Результаты свидетельствовали, что *F. tularensis* subsp. *holarctica* переносится в личинку комара из водной среды обитания и поддерживается через стадии развития (личинки, куколки и взрослого комара) у 25 % взрослых комаров. Инфицированные комары передавали возбудителя в кровь при системе питания *in vitro*, однако в экспериментах по трансмиссии не было зафиксировано передачи комарами туляремии мышам. Это позволило предположить, что в природе вероятность такого события происходит с достаточно низкой частотой и механическая передача возбудителя, обеспечивающаяся укусом комара, нуждается в дополнительном втирании его в кожу путем расчесывания.

Вследствие чего в чувствительных хозяевах происходит массивный всплеск репликации возбудителя, т.е. они выступают, как локальные амплификаторы *F. tularensis*, способствуя распространению болезни через кровососущих насекомых, что приводит к контаминации окружающей среды при смерти заболевших животных. Этот сценарий предполагает существование, по крайней мере, двух сложных циклов: микробной обсемененности водной среды, которая через личинок комаров может приводить к инфицированию млекопитающих, и обсемененность наземных обитателей, в том числе, кровососущих насекомых (комаров, слепней, москитов), являющихся векторами, способствующих распространению заболевания. Оба цикла могут обладать общим источником возбудителя, который провоцирует вспышки, длящиеся непродолжительное время (к примеру, месяцы), приводя к массивному размножению *F. tularensis* subsp. *holarctica* в чувствительных хозяевах и контаминации окружающей среды с последующей долговременной персистенцией микроба с медленным снижением его количества во времени.

Необходимость в переплетении этих двух комплексных циклов в пространстве и времени, а также специфических биотических и абиотических факторов, регулирующих распространение заболевания, объясняет присущие этому заболеванию внезапные вспышки и предполагает необходимость дальнейших исследований с целью изучения загадочного жизненного цикла *F. tularensis* [457].

1.2.1.Туляремия в бывшем Советском Союзе и в России

Всех млекопитающих по отношению к туляремийной инфекции и их роли в эпизоотическом процессе разделяют на 3 группы.

- Первая группа. Высоковосприимчивые и высокочувствительные млекопитающие (заражаются при попадании в организм единичных туляремийных бактерий, остро болеют и быстро погибают с интенсивным обсеменением органов и тканей возбудителем). К этой группе относятся все виды мелких мышевидных грызунов,

кроме полевой мыши, зайцеобразные и насекомоядные, за исключением ежей, куторы, выхухоли.

- Вторая группа. Высоковосприимчивые, но малочувствительные млекопитающие (заражаются при попадании в организм единичных бактерий, болеют тяжело, но быстро освобождаются от возбудителя, приобретая устойчивый иммунитет). К этой группе относятся полевая мышь, все виды крыс и сусликов, белки, бурундуки, бобры, ежи, выхухоль, куторы, белозубки и некоторые другие виды млекопитающих.
- Третья группа. Маловосприимчивые и практически нечувствительные млекопитающие. К ним относится большинство хищных млекопитающих и сельскохозяйственных животных.

Наибольшее эпизоотологическое и эпидемиологическое значение имеют животные 1-й группы, поэтому тактика эпизоотологического обследования строится с учетом того, к какой группе относятся обитающие в очаге животные.

Если пионерские работы по изучению туляремии были сделаны американским исследователем Эдвардом Фрэнсисом, то общепризнанно, что наиболее полные исследования туляремии были проведены в бывшем Советском Союзе в 30-х–70-х годах прошлого века Н.Г.Олсуфьевым с коллегами. Туляремия была эндемична для многих регионов Советского Союза и, благодаря большой научно-исследовательской работе, были определены природные очаги и предложена их классификация. С учетом биоценотических и ландшафтных особенностей, Н.Г.Олсуфьевым было предложено природные очаги туляремии классифицировать на: пойменно-болотные; предгорно-ручьевые; луго-полевые; лесные; степные; тундровые; тугайные. В настоящее время, согласно МУ 3.1.2007-05, на территории Российской Федерации выделяют 6 основных ландшафтных типов природных очагов туляремии: луго-полевой, степной, пойменно-болотный, предгорно-(горно)-ручьевой, лесной, тундровый. Отдельно выделяют синантропные (или урбанические) очаги.

- Луго-полевой тип очага. Инфекция поддерживается в популяциях всех видов полевок, зайца-русака и других млекопитающих 1-й группы. Резервуарами и переносчиками инфекции часто служат иксодовые клещи *Dermacentor reticulatus* и *D. pictus*. Очаги расположены в лесной и лесостепной зонах. Первичными биоценозами служат кустарниковые и кочкарниковые луга, опушки леса, поляны; вторичными – поля, агроценозы с находящимися в них скирдами и ометами, а также расположенные по соседству населенные пункты.
- Степной (овражно-балочный) тип очага. Циркуляция возбудителя происходит в популяциях видов-двойников обыкновенной полевки, степной пеструшки и домовой мыши. Активно вовлекаются в этот процесс заяц-русак, хомяк, общественная полевка и другие виды млекопитающих. Резервуарами и источниками инфекции служат также многочисленные виды пастбищных иксодовых клещей *D. reticulatus* и *D. pictus.* Этот тип очага распространен в степной зоне Европейской части Российской Федерации, степях Западной Сибири и Забайкалья.
- Пойменно-болотный тип очага. Имеет многочисленные варианты: озерно-займищный, лиманно-плавневый и т.п. Очаг поддерживается водяной полевкой, ондатрой и другими околоводными млекопитающими 1-й группы. Хранителями инфекции выступают норовые клещи Ixodes apronophorus и некоторые другие виды. Большую роль в циркуляции возбудителя играет вода, особенно в Северном, Северо-Западном районах Восточной Сибири и других регионах России. Возникновению разлитых эпизоотий способствует концентрация зверьков во время паводков. Существенную роль в передаче инфекции от зверька к зверьку, а также человеку, играют слепни и комары. Характерным является интразональное распространение очагов.
- Предгорно-(горно)-ручьевой тип очага. Очаг поддерживается на водяных полевках и других мелких зверьках. Вода инфицируется выделениями и

трупами мелких млекопитающих, а ее низкая температура способствует длительному сохранению возбудителя. Очаги локализуются по берегам ручьев и речек в предгорьях Саян, Кузнецкого Алатау, Кавказа, Алтая и других горных систем.

В очагах первых двух типов существование возбудителя поддерживается, в основном, за счет популяции водяной крысы, в отдельных местах за счет ондатры и других мелких млекопитающих, причем важную роль в циркуляции инфекции играет передача её через воду. В пойменно-болотных очагах в передаче инфекции участвуют так же и кровососущие двукрылые насекомые, а в предгорно-ручьевых – иксодовые клещи. Эти 4 типа природных очагов туляремии эпидемиологически наиболее опасны.

- Лесной тип очага. Инфекция поддерживается в основном среди рыжих полевок, лесных и желтогорлых мышей, а местами – зайцами. Хранителями инфекции служат клещи *I. ricinus, I. persulcatus* и *I. triangulicep*s. Такой тип очага распространен в зоне широколиственных и смешанных лесов, реже - в таежной зоне.
- Тундровый тип очага. Поддерживается за счет разных видов леммингов и других мелких грызунов 1-ой группы. Инфекция сохраняется годами в подстилках гнезд леммингов (на вечной мерзлоте) и во льду. Распространен в тундровой зоне.
- Синантропный (урбанический) тип очага. Очаги находятся на территории городов, поселков или их окраинах. Основными носителями возбудителя туляремии являются синантропные грызуны – домовая мышь и серая крыса. Эпизоотии могут возникать в результате "заноса" возбудителя мигрирующими грызунами из природных биотопов в строения, обычно осенью и в начале зимы, а к весне – затухать. В циркуляцию возбудителя туляремии включаются восточно-европейские обыкновенные полевки, часто заселяющие стога и ометы, расположенные вблизи построек и жилищ человека.

Туляремийные очаги устойчивы, непрерывное существование некоторых из них прослежено более 60 лет, но они могут трансформироваться в результате хозяйственной деятельности человека и изменять свой лоймопотенциал (Ш. Д. Мошковский ввел понятие лоймопотенциала, т. е. величины, характеризующей интенсивность передачи инфекции (1935).

Официальная регистрация туляремии в СССР была введена в 1941 г. С этого времени территориальное распространение природных очагов этой инфекции достаточно хорошо изучено. 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 переходят за него (низовья Печоры, Воркута, Норильск, пойма р. Лены, Чукотка), 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 [52, 55, 57].

Природные очаги туляремии в России не имеют сплошного распространения. Выделяют две обширные территории диффузного размещения очагов туляремии. Первая расположена в пределах Европейской части России, охватывая ее северо-запад, юг и юго-восток. Вторая находится в пределах Западной Сибири, охватывая Западно-Сибирскую низменность, предгорья Алтая и Кузнецкого Алатау. Между этими территориями (от Волги до Уральского хребта) туляремия выявляется лишь в немногих районах [52, 55, 57]. Эпизоотии ежегодно подтверждаются обнаружением значительного числа положительных на туляремию проб из объектов внешней среды. Ежегодно в России регистрируется от 100 до 1000 случаев заболевания людей туляремией, 75 % которых приходится на Северный, Центральный и Западно-Сибирский регионы страны [2, 3, 78].

На территории России в предвоенные годы туляремия проявила себя значительной распространенностью среди людей, преимущественно в сельской

местности. В течение 1946-1956 гг. на территории СССР выявлялись до 100-140 тысяч случаев туляремии у людей в год, тогда и стали проводиться мероприятия по массовой иммунизации против туляремии. Вакцинацией удалось снизить заболеваемость этим инфекционным заболеванием до 1000-2000 случаев в год. В 1993-2001 гг. вспышки туляремии были зарегистрированы в Республиках Башкортостан, Дагестан, Смоленской и Оренбургской областях, г. Москве. Особенностью современной заболеваемости туляремии является то, что более 70 % заболевших составляют не привитые против этой инфекции городские жители. Хотя ежегодно в России против туляремии прививают более 1,5 млн человек (только в 2012 г было вакцинировано 275 559 человек и ревакцинировано 1 240 626 человек) [13], периодическое возникновение вспышек массовых заболеваний у людей (более 1000 зарегистрированных случаев заболевания людей в г. Нижневартовске в 80-е годы прошлого столетия, несколько сотен заболевших во время вспышки в августе-сентябре 2013 г. в г. Ханты-Мансийске), свидетельствуют о достаточно высокой потенциальной опасности туляремии для человека [63, 64]. Несмотря на значительное снижение заболеваемости этой инфекцией в России, и в начале XXI века туляремия остается актуальной проблемой в инфекционной патологии, что связано, прежде всего, с длительностью функционирования природных очагов практически на всей территории Российской Федерации.

1.2.2.Туляремия в странах Европы

В европейских странах и странах Азии нет работ по описанию природных очагов, там регистрируются только вспышки этого заболевания. Первые случаи туляремии людей в Скандинавии описаны Francis, они касаются Норвегии (1929г.) и Швеции (1931г.) [213, 458]. В Центральной Европе впервые случаи туляремии описали в бассейне реки Моравы в 1936 г. [277].

В странах Европы наибольшее эпизоотологическое и эпидемиологическое значение для туляремии имеют зайцы, являясь переносчиками и источниками заболевания для человека [353, 383.]. Клещи, обитающие на зайцах, считаются резервуарами для *F. tularensis*. Однако и

другие наземные и водные животные, такие, как земляные белки, луговые и водные полевки, ондатры и бобры способствуют распространению в окружающей среде *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Возникновение эпизоотий часто связано с предшествующим увеличением плотности численности популяций грызунов. Отмечена корреляция между пиками увеличения популяций зайцев и полевок и вспышками туляремии у людей в Швеции в 1960-х и 1970-х годах [257]. В Центральной Европе в Южной Моравии (Чешская Республика) в 1961-1962 г. и на Украине в 1948-1949 г. описаны случаи вспышек туляремии среди работников сахарной промышленности, т.к. хранилища сахара при его производстве привлекают большие популяции грызунов [138]. В Швеции в 1966-1967г.г. было выявлено более 700 случаев заболевания у людей, которые были связаны с заражением сена тушками погибших от туляремии грызунов, что приводило к аэрозольному инфицированию [171].

В Испании первые случаи туляремии зарегестрированны только в 90-х годах прошлого столетия. Вероятным источником появления туляремии в Испании считается широкомасштабный экспорт зайцев для охоты из Центральной Европы [383] и эпидемиологическая цепочка была связана, прежде всего, с охотниками [277]. Еще одна уникальная вспышка ульцерогландулярной формы туляремии в центральной провинции Cuenca в Испании произошла в 1997 г. после контакта с раками [106]. Это был первый случай туляремии, связанный с рыбной ловлей. Возникшее кратковременое загрязнение речной воды было причиной вспышки заболевания. Наличие *F. tularensis* было выявлено методом ПЦР в образцах воды, в раках и в пунктатах лимфоузлов заболевших людей.

В 2000 г. в Косово была вспышка заболевания с лихорадкой, фарингитами и выраженной шейной лимфоаденопатией, хотя ранее о туляремии в этом регионе не сообщалось [399]. Серологический анализ подтвердил 327 случаев туляремии. Не исключено, что заболевание

существовало в Косово и ранее, но не диагносцировалось из-за отсутствия большого числа заболевших людей. В период 2001-2010 г.г. в Косово отмечался самый высокий ежегодный уровень заболеваемости туляремией в Европе – 5,2 человек на 100 000 населения, в то время, как в других странах этого континента – в Швеции, Финляндии, Словакии, Чехии, Норвегии, Сербии и Черногории, Венгрии, Болгарии и Хорватии – эти показатели составляют 2,80; 1,19; 1,0; 0,81; 0,42; 0,4; 0,36; 0,21 и 0,15 на 100 000 человек, соответственно.

Безусловно, уровень заболеваемости туляремией в странах Европы достаточно низкий, однако сохранение очагов и появление вспышек этого заболевания у людей требует мониторинга эпидемиологической ситуации. Наиболее интенсивно эти работы ведутся в Швеции и в последнее время в Турции. Анализ эпидобстановки в этих странах позволяет считать, что вспышки имеют выраженный сезонный характер и в большинстве случаев они регистрируются в конце лета и в начале осени [149, 190, 380, 390, 448, 455]. Исключением стала вспышка в Швеции в осенне-зимний период в 1966-1967г.г., в результате которой заболело более 2700 человек [171.]. Исторически эндемичными для туляремии районами в Швеции считаются северные, однако, в 2000 г. было зарегистрировано большое количество случаев за их пределами, что может указывать на расширение эндемичных ареалов заболевания [191].

Проведенный Desvars A. с соавторами (2015) [176] анализ эпидемиологии и экологии туляремии в Швеции в период с 1984 по 2012 г.г. показал, что из зарегистрированных 4830 случаев заболевания 3524 отвечают всем критериям туляремии. Было установлено, что средний показатель заболеваемости увеличился в 10 раз от 0,26/100000 человек во время 1984-1998г.г. до 2,47/100000 человек в течение 1999-2012г.г. ($p < 0,001$). Исследование районов, где регистрировались случаи заболевания туляремией показало, что заболеваемость выше в местах вблизи озер и рек, в то время как вблизи морской береговой линии заболеваемость очень низкая. Были предприняты определенные усилия по выявлению закономерностей вспышек туляремии в

зависимости от высоты над уровнем моря и ландшафтом местности. Более высокая заболеваемость в 3-х районах с хвойными лесами и в альпийском регионе требует, по мнению авторов, дальнейших исследований по мониторингу эпидситуации. Исследователями установлено, что заболеваемость туляремией мужчин достоверно выше заболеваемости женщин; чаще болеют люди в возрасте от 40 до 70 лет. Эта большая работа шведских исследователей, аналогичная в определенной мере работе, проделанной в прошлом столетии Н.Г. Олсуфьевым с коллегами в России, говорит о том, что проблема туляремии актуальна и для европейских стран.

1.2.3. Туляремия в Северной Америке

После первого описания туляремии у человека, проведенного W.B. Wherry и B.H. Lamb в 1914 г., число сообщений о случаях туляремии в США к 1945 г. достигло 14 000 [267]. Наибольшее число заболеваний наблюдалось в штате Иллинойс и соседних с ним регионах, в 1945 г. в этом штате было зарегистрировано 2267 случаев [267]. При исследованиях путей распространения инфекции стало очевидно, что источником туляремии являются кролики. В 1942 г. E. Francis было отмечено, что две трети всех случаев туляремии связаны именно с контактами с дикими кроликами [215]. Кролики обладают очень высокой чувствительностью к инфицированию *F. tularensis*, о чем свидетельствует высокая смертность во время эпизоотий [422]. Зайцы (*Lepus articus*, *americanus*, *townsendii* и *californicus*) не являются важными источниками туляремии в Северной Америке, поскольку считаются гораздо более устойчивыми к заболеванию, кроме того, охота на них велась менее интенсивно. Важность диких кроликов как источника инфекции подтверждается сообщением о распространении очага туляремии со Среднего Запада до Новой Англии (исходно свободной от этого заболевания), связанная с завозом этих животных для разведения [454].

Наиболее важным переносчиком инфекции в Северной Америке являются клещи. Среди 700 случаев туляремии, зарегистрированных с 1938 по 1948 г.г., 56% считается результатами укуса клещей, а 31 % – результатом

контакта с инфицированными кроликами [476]. О том же свидетельствуют более поздние исследования: изучение порядка 1000 случаев в 1980-е годы в Арканзасе, Канзасе, Луизиане, Оклахоме и Техасе показало, что в 63 % случаев заболевание возникло в результате присасывания клеща, а в 23 % – в результате контакта с кроликами [452].

Другим эпидемиологическим звеном, обеспечивающим передачу туляремии, является укус слепня *Chrysops discalis*. По мнению W.L. Jellison [269], слепни представляют собой наиболее вероятный путь передачи *F. tularensis* во многих районах США, поскольку эти насекомые питаются преимущественно на кроликах и грызунах.

В 1923 г. R.R. Parker показал, что овцы также чувствительны к *F. tularensis*. Описаны тяжелые эпизоотии, приводящие к гибели большого числа овец. Было высказано предположение, что вспышки следуют после эпизоотий среди грызунов и зайцеобразных [268, 377].

Американские ученые, учитывая опыт российских коллег, с особым вниманием исследовали водно-ассоциированный жизненный цикл *F. tularensis* в Северной Америке. В обзоре R.R. Parker описано более 100 случаев туляремии человека, связанных с водой [377] Среди 3000 индейцев, проживающих в Канаде в районе Великих Озер между Онтарио и Манитобой, где имели место эпизоотии среди грызунов, было выявлено до 12 % серопозитивных реакций у обследованных [484]. По мнению W.L. Jellison, присутствие *F. tularensis* в водоемах и окружающей болотистой местности является предварительным условием для начала эпизоотий среди ондатр и бобров, когда возбудитель выделяется во внешнюю среду с экскрементами инфицированных животных [267, 269]. Была показана возможность перехода туляремии в хроническую форму у экспериментально инфицированных полевок, вследствие чего у них набдюдалась бактериурия, что могло приводить к контаминации воды [117]. R.R. Parker с соавторами показали, что *F. tularensis* может выживать в иле и воде в течении 3 месяцев, сохраняя свои вирулентные свойства и способность к ифицированию животных и людей [377].

Одним из основных источников туляремии в Канаде считается живущая в воде ондатра (*Ondatraz ibethicus*). Кроме того, канадские бобры, в отличие от европейских, по-видимому, более чувствительны к *F. tularensis* subsp. *holarctica* и участвуют в поддержании водных очагов [355]. Тем не менее, в целом в Северной Америке число эпизоотий, связанных с водой, намного меньше, чем в России. Прежде всего это обусловлено тем, что в Северной Америке преобладает *F. tularensis* subsp. *tularensis,* в отличие от Европы и России, где распространен *F. tularensis* subsp. *holarctica*, для которого более характерна связь с водной средой.

В Северной Америке недавно описаны эпизоотии среди норок [253] и луговых собачек [384]. Последняя вспышка в июле 2002 г. произошла в питомнике экзотических животных в Тексане. Погибло более 250 луговых собачек, и от погибших животных была выделена культура *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Инфицированные животные были отловлены в дикой природе, что и явилось причиной заражения животных в питомнике. Заболевание распространилось посредством каннибализма, и у всех инфицированных луговых собачек были обнаружены признаки орофарингеальной туляремии. Вероятно, луговые собачки могли являться носителями хронической формы заболевания, так как *F. tularensis* была выделена от серопозитивных собачек.

В заключение можно отметить, что, хотя такое заболевание, как туляремия человека, достаточно редко встречается, оно выявляется на всей территории Соединенных Штатов [250]. С 1981 по 1987г.г. ~ 60 % случаев туляремии, зарегистрированных в Соединенных Штатах, имели место в центральных штатах - Арканзас, Луизиана, Миссури, Оклахома или Техас [452]. В последующие годы в период с 1990 по 2000 г.г. до 100-200 случаев регистрировали в тех же штатах: Арканзас, Миссури, Оклахома, а также Южная Дакота.

1.3. Внутривидовое разнообразие возбудителя туляремии

1.3.1. Таксономия *Francisella tularensis*

Подробные эпидемиологические исследования, проводившиеся в течение многих десятилетий в бывшем Советском Союзе, в странах Восточной Европы и США позволили сделать вывод, что при описании эпидемиологии туляремии необходимо учитывать существенные различия между подвидами *F. tularensis*: *tularensis* (то же, что и *nearctica*) – тип А, *holarctica* (то же, что и *palaearctica*) – тип В, которые различаются по вирулентности для некоторых млекопитающих (в частности, зайцеобразных). Эти предложения по таксономическому упорядочиванию *F. tularensis* принадлежат российскому ученому-микробиологу Н.Г. Олсуфьеву – в 1959 г. он впервые предложил разделение туляремийного микроба на два типа – А и Б, различающиеся по ареалу распространения и вирулентности [53]. Тип А был выделен из организма кроликов и человека в Северной Америке и являлся высоковирулентным в отношении человека. Тип В туляремийного микроба был распространен в основном в Европе и Азии и показал себя менее вирулентным для человека, хотя и вызывал массовые эпизоотии среди грызунов. Есть основание считать, что подвиды *F. tularensis* отличаются по отношению к их экологическим нишам [283]. По мнению W.L. Jellison, неарктическая расса (тип А) распространена среди зайцев и диких кроликов и передается через укусы иксодовых клещей, в то время как голарктическая раса туляремийного микроба более распространена среди грызунов и передается водным путем [267]. В настоящее время таксономические исследования, касающиеся существования видов и подвидов *F. tularensis,* активно продолжаются.

Родовое название *Francisella* было официально утверждено в 1970 г. Международным Комитетом по систематике бактерий [350]. Это единственный род семейства *Francisellaceae,* принадлежащего к γ-подклассу протеобактерий. До последнего времени к роду *Francisella* относили два вида: *Francisella tularensis* и *Francisella philomiragia*. В настоящее время появились публикации, в которых описаны заболевания рыб, вызванные новыми видами франциселл:

Francsiella noatunensis (синонимы *Francisella piscicida* и *Francsiella asiatica*) и *Francisella hispaniensis* [153].

В пределах вида *F. tularensis* выделяют четыре подвида: неарктический (*F. tularensis* subsp. *tularensis)*, среднеазиатский *(F. tularensis* subsp. *mediasiatica)*, *F. tularensis* subsp. *novicida* (*F. novicida*) и голарктический (*F. tularensis* subsp. *holarctica*), последний включает в себя три биологических варианта: биовар I (эритромицин-чувствительный (EryS), распространенный в Старом и Новом свете, биовар II (эритромицин-резистентный (EryR), выделяемый только в некоторых регионах Европы и Азии, и японский биовар (bv. japonica). 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 [54]. Таксономическое положение *F. novicida* на сегодняшний день остается неопределенным. Согласно списку названий бактерий, утвержденному в 1980 г, *F. novicida* является отдельным видом, однако он был причислен к виду *F. tularensis* как подвид *novicida* [260]. В настоящее время исследователи L.C. Kingry и J.M. Petersen, основываясь на клинических, экологических, геномных и вирулентных различиях между *F. novicida* и *F. tularensis*, предлагают вновь рассматривать эти микроорганизмы в качестве отдельных видов [289]

Степень патогенности туляремийного микроба различна у разных подвидов *F. tularensis* [140]. Наибольшей вирулентностью для человека обладает *F. tularensis* subsp. *tularensis* (nearctica) – уровень смертности зараженных этим штаммом людей без лечения достигает 60 % [177]. Даже при лечении заболевших людей современными эффективными антибиотиками летальность от туляремии, вызванной *F. tularensis* subsp. *tularensis*, составляет несколько процентов [175].

Генетические основы высокой степени вирулентности этого подвида до сих пор неизвестны. Хотя *F. tularensis* subsp. *tularensis*, как полагают, происходит из Северной Америки, были опубликованы данные о выделении штаммов этого подвида на территории Европы [244, 272]. В основном же все

европейские изоляты *F. tularensis* относятся к подвиду *holarctica* и, хотя инфекция, вызванная штаммами *F. tularensis* этого подвида, вызывает тяжелую патологию, болезнь редко заканчивается смертельным для человека исходом [140]. На территории России встречается *F. tularensis* подвида *holarctica* с двумя биоварами – I Ery(S) и II Ery(R), циркуляция которых осуществляется, главным образом, среди грызунов и зайцеобразных.

По поводу вирулентности *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* опубликованы немногочисленные данные, свидетельствующие о способности этих бактерий вызывать инфекцию у человека и кроликов [372].

Возбудитель *F. tularensis* подвида *novicida* считается невирулентным для человека; единичные случаи выделения туляремийного микроба этого подвида от людей касались только лиц со сниженным иммунным статусом [311]. Следует отметить, что определение различий в вирулентности штаммов *F. tularensis* методом биопробы затруднено, так как наиболее широко применяемая биомодель экспериментальной туляремии – мыши – высоко чувствительны к заражению всеми подвидами *F. tularensis*, кроме подвида *novicida*.

С учетом вышеизложенного, подвидовая идентификация культур *F. tularensis*, выделенных из клинических изолятов или объектов окружающей среды, является важнейшим этапом диагностики, так как обеспечивает предварительную оценку степени вирулентности и эпидемиологической опасности выделенной культуры. Внутривидовая дифференциация возбудителя туляремии традиционно основывается на географической локализации места выделения культуры, ее патогенности для человека и животных, а также на ряде биохимических признаков: способности к сбраживанию сахарозы и глицерина, цитруллинуреидазной и β-лактамазной активности (таблица 6), а также чувствительности к эритромицину.

Таблица 6 – Характеристика подвидов *F. tularensis*

Признак		Подвиды *F. tularensis*			
		tularensis	*holarctica*	*mediasiatica*	*novicida*
Ареал распространения		Северная Америка	Северное полушарие, за исключением Англии, Исландии и Португалии.	Район поймы рек Чу и Или (Казахстан) и дельты реки Амударья (Узбекистан).	Северная Америка
% гомологии по гену 16 S рРНК с *F. tularensis* ATCC 6223		≥99,8	≥99,8	≥99,8	≥99,8
LD_{50}, м.к. (источник)	люди	<10 [244; 382]	$<10^3$ [187, 382]	н/д*	$>10^3$ [187]
	кролики	<10 [299; 382]	$>10^6$ [299, 372]	$>10^6$	$>10^6$ [187, 382]
	мыши	1-10 [299, 372]	1-10 [299; 382]	1-10	$>10^3$ [187]
Биохимические свойства					
Рост на среде с цистеином		+	+	+	–
β-лактамазная активность		+	+	–	+
Ферментация сахарозы		–	–	–	+
Ферментация глицерина		+	–	+	+
Продукция цитруллинуреидазы		+	–	+	+

*Примечание:**н/д – нет данных

В настоящее время для видовой и подвидовой идентификации *F. tularensis* также применются методы молекулярного типирования: определение межгенных повторяющихся (ERIC-PCR) и внегенных палиндромных последовательностей (REP-PCR), применение универсальных (случайных) праймеров в системе RAPD-PCR [391], анализ полиморфизма единичных нуклеотидов – SNP-типирование [374], MLVA- типирование [274]. Однако их практическое использование часто ограничено сложностями методики, проблемами с воспроизводимостью и оценкой результатов.

1.3.2. Молекулярно-генетическая видовая и подвидовая идентификация возбудителя туляремии

Одной из ключевых задач микробиологии и эпидемиологии является определение и классификация бактерий (типирование), позволяющая не только установить возбудителя инфекции, но и выяснить закономерности распространения, циркуляции и эволюции патогена.

Типирование – фенотипический или генетический анализ изолятов бактерий на уровне вида/подвида, осуществляемый для выявления комплекса характеристик, специфичных для штаммов или клонов. Важнейшей характеристикой любого метода типирования является его разрешающая способность, т.е. способность метода различать как отдельные типы, так и два штамма, случайно отобранные из бактериальной популяции. Для количественной оценки дискриминирующей способности методов типирования применяют индекс разнообразия Симпсона [261], который рассчитывают по формуле:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{S} n_j (n_j - 1)$$

где: S — число групп, на которое данный метод разделяет всю выборку штаммов, nj — число штаммов в j-й группе; N — общее число штаммов в исследованной выборке.

Для методов с максимальной разрешающей способностью индекс Симпсона должен быть равен 1. Это означает, что метод может отнести к различным типам два любых штамма.

Исторически первоначально для типирования бактерий использовались фенотипические методы, основанные на выявлении таких свойств, как способность к утилизации отдельных субстратов (биохимическое типирование), наличие общих антигенных детерминант (серотипирование), чувствительность к бактериофагам (фаготипирование), а также к антибактериальным препаратам (типирование по антибиотикограмме). К недостаткам этих методов, кроме значительной трудоемкости, можно отнести

невозможность оценивать эволюционные связи и структуру бактериальных популяций.

Высокой разрешающей способностью обладают методы электрофоретического исследования компонентов микробной клетки (белков и липополисахаридов). Один из вариантов таких методов – мультилокусный электрофорез ферментов (multilocus enzyme electrophoresis – MLEE) [418], основанный на изучении различных аллелей ферментов, участвующих в ключевых метаболических путях бактерий, так называемых ферментов «домашнего хозяйства». Гены указанных ферментов также обозначаются как гены «домашнего хозяйства». Этот метод послужил основой для разработки генотипического метода мультилокусного секвенирования.

Развитие спектроскопических технологий позволило использовать для типирования бактерий методы, основанные на MALDI-TOF спектроскопии (matrix-assisted laser desorption ionization time-offlight – времяпролетная лазерная десорбционная ионизация, ассоциированная с матрицей). MALDI-TOF спектроскопия занимает промежуточное положение между фенотипическими и генотипическими методами исследования, поскольку эта технология может использоваться для анализа как белков, так и нуклеиновых кислот. Принцип метода основан на ионизации лизата бактериальной культуры лазерным пучком в мощном электрическом поле. Молекулярная масса ионизированных молекул биологических полимеров, присутствующих в лизате, определяется по времени пролета до детектора. При использовании специальных условий удается регистрировать масс-спектры молекул преимущественно белковой природы. Получаемая с достаточным разрешением и точностью, воспроизводимая в стандартных условиях карта белковых масс оказывается уникальной для данного микробного вида/подвида характеристикой по типу «отпечатков пальцев». MALDI-TOF анализ протеомного состава бактерий в сочетании с соответствующими базами данных обеспечивает очень высокий уровень разрешения и может быть использован не только для типирования бактерий,

например метициллинрезистентных стафилококков [263], но и для их видовой идентификации [184, 185, 431].

В настоящее время, наряду с вышеуказанными методами типирования, широко используется и развивается молекулярно-генетическое типирование, или генотипирование. Наиболее известными и распространенными методами генотипирования являются:

1) гибридизация иммобилизированной ДНК исследуемого микроорганизма с ДНК-зондами различной специфичности (гибридизация по Саузерну [434] в различных модификациях;

2) гибридизация тотальной геномной ДНК исследуемого микроорганизма с олигонуклеотидными зондами, специфичными для всех или большинства из известных генов данного вида бактерий, нанесенных на микрочип [431];

3) электрофоретическое изучение плазмидного профиля бактерий (количества и размера плазмид) и/или рестрикционных карт плазмид [339]. Однако из-за нестабильности плазмид, частой утраты бактериями одних и приобретения других плазмид разрешающая способность этих методов оказалась недостаточной;

4) анализ длин рестрикционных фрагментов (restriction fragment length polymorphism — RFLP). Бактериальную ДНК обрабатывают рестриктазами и анализируют с помощью электрофореза или гель-электрофореза в пульсирующем поле (Puls Field Gel Electrophoresis — PFGE), позволяющем разделять фрагменты ДНК с большой молекулярной массой. Степень генетического родства сравниваемых изолятов оценивают по количеству и расположению рестрикционных фрагментов (полос на электрофорезе) [229, 230, 337].

5) метод ПЦР-«фингерпринтинг» основан на амплификации бактериальной ДНК с использованием «случайных» (универсальных) праймеров или праймеров, специфичных для отдельных видов бактерий, с электрофоретическим анализом продуктов амплификации [227, 432, 453].

Генетическое родство оценивают по количеству и расположению фрагментов (полос);

6) мультилокусный анализ числа тандемных повторов (multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis – MLVA). В геноме практически всех бактерий встречаются фрагменты ДНК, состоящие из повторяющихся нуклеотидных последовательностей (тандемные повторы), при этом число повторов может значительно варьировать. В ряде случаев повторы обнаруживаются в генах белков, в других случаях функции генов неизвестны. Определение размеров таких фрагментов ДНК (числа входящих в них повторов) может быть осуществлено при обычном электрофорезе ампликонов в агарозном геле или с применением методов масс-спектрометрии. Создана международная база данных тандемных повторов (http://vntr.csie.ntu.edu.tw) [141], что открывает хорошие возможности для стандартизации метода;

7) секвенирование отдельных локусов. Метод основан на особенностях отдельных видов бактерий и не имеет универсального характера;

8) типирование мультилокусным секвенированием (multi locus sequence typing, MLST). Метод основан на прямом определении нуклеотидной последовательности соответствующих генов, как правило, генов «домашнего хозяйства» (обычно 6-7 генов), имеющих достаточное число аллелей (более 10), характеризующихся медленным накоплением мутаций и селективно нейтральных. В результате каждый штамм характеризуется специфическим «аллельным профилем» (или «сиквенс-типом») по выбранным локусам. Сравнение полученных данных между собой, выяснение эволюционных связей между штаммами и их генетического расстояния производится с использованием специализированного программного обеспечения [329, 330].

Идентификацию *F. tularensis* и дифференциацию ее подвидов традициионно проводят, исследуя ростовые характеристики, биохимический анализ и вирулентность для кроликов [55]. Однако, помимо больших затрат времени и труда, эти методы приводят к повышению риска внутрилабораторного заражения, так как требуют работы с живыми культурами

F. tularensis. Поэтому очень высок интерес к методам, основанным на анализе ДНК, обладающих повышенной разрешающей способностью и, к тому же, позволяющих минимизировать контакты с живыми патогенными микроорганизмами.

Молекулярно-генетические методы на настоящий день применяют для дифференциации рода *Francisella* и вида *F. tularensis,* а также для подвидовой и штаммовой идентификации туляремийного микроба.

Как и для многих других микроорганизмов, для идентификации бактерий рода *Francisella* применяется секвенирование нуклеотидной последовательности гена 16S-РНК с последующим сравнением с известными последовательностями. Кроме того, на основе некоторых родовых отличий в последовательности этого гена, были сконструированы праймеры для индикации бактерий рода *Francisella* [114, 127]. Однако, вследствие высокой степени консервативности данного гена, с помощью предложенных праймеров, как отмечают авторы, также детектируются и систематически близкие группы микроорганизмов, такие, как *F. philomiragia* и некоторые эндосимбионты клещей, например, *Wolbachia persica* [114].

С распространением методов полногеномного секвенирования и увеличением количества штаммов рода *Francisella* с известной последовательностью ДНК (к настоящему времени частично или полностью секвенированы геномы 52 штаммов *F. tularensis,* 3 штаммов *F. philomiragia,* 2 штаммов *F. noatunensis* и 2 штамма рода *Francisella* с неуточненным систематическим положением, доступные по адресу http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Francisella), были предприняты поиски более специфичных генетических мишеней для идентификации микроорганизмов этого рода.

В качестве такой мишени используется, например, инсерционный элемент ISFtu2. Этот генетический элемент размером 865 п.о., относящийся к семейству IS5 [328], присутствует у всех видов рода *Francisella* и всех подвидов туляремийного микроба в количестве от 1-2 копии у *F. philomiragia*

до 26-30 копий в геноме *F. tularensis* subsp. *holarctica*. [459]. Высокая специфичность и мультикопийность ISFtu2 позволила использовать его в качестве мишени для анализа методом ПЦР в реальном времени [469].

Также в качестве генетических мишеней используются гены, кодирующие некоторые родо- и видоспецифичные белки:

1) входящий в состав оперона *igl*ABCD ген *igl*C [469]. Этот ген кодирует необходимый для внутриклеточного размножения туляремийного микроба в макрофагах белок размером 23 кДа [235, 239]. Гомология указанного оперона среди штаммов *F. tularensis* превышает 99 %, причем у вирулентных штаммов он присутствует в геноме в двух копиях, а у штаммов подвида *novicida* – в одной [289]. Также у 4-х из 15-ти протестированных изолятов *F. philomiragia* обнаружен ген *igl*C [469];

2) ген *fopA*, кодирующий белок внешней мембраны [357]. Данный ген выявлен у всех исследованных штаммов туляремийного микроба, относящихся ко всем подвидам, а так же у всех штаммов *F. philomiragia* [469];

3) ген *tul4*, кодирующий 17 кДа липопротеин внешней мембраны туляремийного микроба [421]. В отличие от перечисленных выше мишеней, по данным J.L.Versage [469], этот ген выявлен только в штаммах *F. tularensis*, но не выявлен в штаммах *F. philomiragia*, хотя для них описан иммунологически схожий белок [287].

Для повышения надежности анализа и снижения вероятности неспецифического ответа была разработана мультилокусная ПЦР-тест-система с использованием в качестве мишеней локусов ISFtu2, *igl*C и *tul*4 [469]. При этом анализируемый образец считается содержащим ДНК *F. tularensis* лишь в случае положительного ответа по всем трем локусам. Использование такой мультилокусной системы позволяет дифференцировать *F. tularensis* от генетически близких микроорганизмов. Так, на основе высокой степени сходства в последовательностях генов 16S рРНК (более 97 % –*F. tularensis* и до 95,9 % – *F. philomiragia*), некоторые другие микроорганизмы были классифицированы, как вероятные члены семейства *Francisellaceae*, хотя их

родовая принадлежность не была определена. К ним относятся внутриклеточная бактерия *Wolbachia persica*, изолированная из клещей *Argas arboreus*, а также эндосимбионты клещей *Amblyomma maculatum*, *Ornithodoros porcinus* и *O. moubata*. Francisella-подобные эндосимбионты также были обнаружены у некоторых клещей рода *Dermacentor*, в том числе *D. variabilis*, *D. andersoni*, *D. hunteri*, *D. nitens*, *D. occidentalis* и *D. albipictus* [440]. Характеристика этих организмов в значительной степени ограничивается методами на основе ПЦР, так как они практически не культивируются на микробиологических средах. Такие микроорганизмы обозначаются аббревиатурой FLE – Francisella-like tick endosymbionts. Четкая дифференциация этих микроорганизмов и *F. tularensis* крайне важна, так как многие колонизированные FLE клещи способны также быть переносчиками туляремии, и ложный сигнал может привести к неверной оценке эпидемиологической обстановки [344]. Описаная выше мультилокусная тест-система позволяет решить эту задачу [300].

С учетом упоминавшегося выше различия в патогенности среди подвидов туляремийного микроба, эффективная подвидовая дифференциация изолятов *F. tularensis* является первоочередной задачей, для решения которой, помимо перечисленных в предыдущем разделе биохимических методов, применяются и молекулярно-генетические методы. Проведение эпидемиологических исследований и оценка эволюционных связей между различными географическими группами возбудителя туляремии предполагает идентификацию отдельных штаммов. Причем, ввиду фенотипической однородности *F. tularensis*, для этого применимы только методы молекулярного типирования.

В исследовании R. Thomas с соавторами [459] изучена возможность использования двух мобильных генетических элементов – ISFtu1 и ISFtu2 – для типирования штаммов туляремийного микроба методом RFLP. ДНК 17-ти эпидемиологически несвязанных изолятов *F. tularensis* после обработки эндонуклеазами рестрикции разделялись электрофоретически и определялся

профиль фрагментов, содержащих в своем составе мобильные генетические элементы ISFtu1 и ISFtu2 с помощью специфических зондов. На основе RFLP профилей исследованных ДНК протестированные изоляты *F. tularensis,* несмотря на разное географическое происхождение штаммов, группировались согласно их подвидовой принадлежности. При этом была отмечена значительная степень сходства RFLP-профилей у представителей подвидов *tularensis* и *mediasiatica*, что может свидетельствовать об общей эволюционной истории этих подвидов. Кроме того, отдельную группу составляли штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica* bv. japonica. При этом не было возможности различить индивидуальные штаммы, за исключением атенуированного штамма *F. tularensis* subsp. *tularens*is ATCC 6223.

Также ограниченная генетическая вариабельность в пределах вида *F. tularensis* была продемонстрирована M. Broekhuijsen с соавторами [126] при анализе 27 штаммов, представляющих все четыре подвида, с помощью ДНК-микрочипов, созданных на основе 1832 клонов из shotgun-библиотеки, использованной для секвенирования высоковирулентного штамма *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4. Различия в степени гибридизации при сравнении отдельных штаммов позволили обнаружить от 0,1 до 3,7 % дифференциально гибридизующихся зондов (differentially hybridizing probes (DHPs). Это позволило отнести исследуемые штаммы к одному из 5 кластеров, соответствующих четырем подвидам *F. tularensis* и *F. tularensis* subsp. *holarctica* bv. japonica. При этом была также отмечена высокая степень геномного сходства между штаммами подвидов *tularensis* и *mediasiatica,* несмотря на заметные различия в их вирулентности и географическом происхождении. Кроме того, было выявлено восемь регионов дифференциации (RD) размером от 0,6 до 11,5 т.п.о., вместе образующих 21 открытую рамку считывания, разделяющих умеренно вирулентные штаммы подвида *holarctica* и высоковирулентные штаммы подвида *tularensis*. Один из этих регионов, обозначенный RD1, впервые позволил разработать специфическую ПЦР-тест систему для определения каждого из четырех подвидов. С помощью пары

праймеров, комплементарных фланкирующим RD1 областям, авторы смогли различить все четыре подвида и, кроме того, выявить японский биовар голарктического подвида по отличающемуся размеру получаемого ампликона [126]. Н.А. Осиной на основании этой работы была разработана методика идентификации подвидов *F. tularensis* с помощью двухэтапной ПЦР с тремя парами праймеров с использованием в качестве ДНК-мишени региона RD1 [62].

В работе A. Johansson [272] было показано, что применение методов ПЦР-фингерпринтинга, таких как REP-ПЦР и ERIC- ПЦР, а также RAPD-ПЦР позволяет провести дифференциацию *F. tularensis* лишь на видовом и подвидовом уровне. При этом индекс Симпсона не превышал 0,65. Кроме того, при секвенировании одного из RAPD-ампликонов авторам удалось определить последовательность, на основе которой был создан праймер, позволяющий отнести исследуемый штамм к голарктическому подвиду.

Подобная оценка перечисленых методов типирования была проведена V.A. de la Puente-Redondo [391]. При этом было показано, что, хотя индекс Симпсона составлял 0,14 для REP-ПЦР, 0,52 – для ERIC- ПЦР и от 0,39 до 0,65 – для RAPD (в зависимости от используемых праймеров), при совместном применении этих методов он увеличился до 0,90. Это позволило авторам выявить 17 индивидуальных генотипов среди 41 изолята *F. tularensis,* выделив отдельные группы внутри подвидов. Однако, и в этом случае индекс Симпсона не достигал 0,95 – значения, необходимого для типирования индивидуальных изолятов [439].

Еще одним методом ПЦР-фингерпринтинга, применимым для типирования возбудителя туляремии, является анализ спектра ампликонов, полученных в ПЦР с использованием праймера Chi1F, содержащего в своей последовательности участок, гомологичный *chi*-сайтам *E. coli*. Но и в данном случае удается определить лишь подвидовую принадлежность исследуемого штамма *F. tularensis*. [6].

Следует отметить, что по результатам A. Johansson с сотр., REP и ERIC последовательности не представлены в геноме *F. tularensis* [272], также как и последовательности, полностью гомологичные Chi1F. С учетом этого, по всей видимости, данные методы являются вариантами RAPD-PCR [272].

С целью повышения дискриминационной способности был применен анализ вариабельных нуклеотидных тандемных повторов (variable-number tandem repeat (VNTR)). Наиболее полно этот способ типирования *F. tularensis* разработан в работе Johansson A. [274]. Предложенная схема представляет собой мультилокусный VNTR-анализ (multiple-locus VNTR analysis (MLVA)). Авторами разработана система MLVA-типирования на основе 25 VNTR-локусов (2 из них были использованы в ранее опубликованных работах). Анализируя 192 изолята *F. tularensis* всех 4 подвидов, авторами было выделено 120 индивидуальных генотипов. При этом применение для анализа маркеров с разной степенью внутривидовой вариабельности позволило разделить исследуемые штаммы не только по подвидам, но и по более мелким группам в пределах одного подвида. Так, *F. tularensis* subsp. *tularensis* делился на 2 основные группы - AI и AII, причем AII была генетически значительно более однородной, что может свидетельствовать об ее происхождении от AI. При этом, несмотря на перекрытие географических ареалов распространения штаммов, принадлежащих к этим группам, была прослежена некоторая степень корреляции ареала с групповой принадлежностью. Также определенная генетическая обособленность двух штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis*, выделенных на территории Словакии, позволила выдвынуть предположение о сравнительно давнем проникновении штаммов этого подвида в Европу.

Изоляты *F. tularensis* subsp. *holarctica,* несмотря на большую географическую распространенность, оказались менее вариабельными, что может говорить о сравнительно молодом возрасте голарктического подвида. Штаммы этого подвида были разделены на кластеры BI – BV. При этом даже в рамках одной группы североамериканские и евразийские штаммы четко различались между собой, что свидетельствует об отсутствии

продолжительного непрерывного обмена штамами между Новым и Старым светом. Причем большее генетическое разнообразие североамериканских изолятов, по сравнению с евразийскими, позволяет выдвинуть предположение о происхождении этого подвида на территории Северной Америки. Также примечательно, что штаммы голарктического подвида, выделенные в Японии, образуют отдельный кластер BV, при этом они настолько отличаются от остальных штаммов данного подвида, что, по мнению авторов, может служить основанием для предоставления японскому биовару подвидового статуса. Основным результатом описываемой работы является подтверждение клональной структуры популяций туляремийного микроба, то есть генетической идентичности или же очень высокого генетического родства между штаммами, выделенными в определенной географической локации. Таким образом, предложенная система типирования позволяет проводить дискриминацию не только на уровне подвидов, но и на уровне отдельных изолятов, определяя также регион происхождения штамма. Данный подход может быть незаменимым при эпидемиологическом расследовании или для изучения процесса эволюции *F. tularensis* и миграции отдельных филогенетических групп.

Разработанный набор VNTR-маркеров целиком, либо в редуцированном виде для уменьшения трудозатрат при сохранении достаточной для данного исследования разрешающей способности, довольно широко используется для типирования возбудителя туляремии [127, 142, 202, 231, 490]. Так, A.J. Vogler для генотипирования *F. tularensis* предложил MLVA-систему с редуцированным до 11 количеством VNTR-маркеров [473].

Из отечественных исследований можно упомянуть работу А.С. Водопьянова, в которой приведены данные об изучении генетического разнообразия коллекции из 352 штаммов *F. tularensis*, выделенных в различных регионах мира в период с 1941 по 2004 г.г., с помощью MLVA по 4 VNTR-локусам [7]. Анализ идентификационных генотипов штаммов позволил сгруппировать их в 61 вариант от A до I с частотой встречаемости от 0,002 до

0,142, а кластерный анализ — распределить среди 9 кластеров с разным числом составляющих. Показано реальное существование среди них генотипической гетерогенности и географического разнообразия, а также определенных типов штаммов. Кроме того, с целью проведения территориально-пространственного анализа распределения генотипов изученных штаммов была разработана геоинформационная система (ГИС) "Туляремия".

Также можно отметить, что MLVA-типирование применяется и для других, близких к *F. tularensis*, микроорганизмов. Например, в геноме *F. noatunensis* были обнаружены 7 VNTR-локусов, которые были использованы для внутривидового типирования штаммов *F. noatunensis*, выделенных из различных видов рыб в Норвегии, Японии, Индонезии и Чили, а также *F. philomiragia* [125]. Среди 33 изолятов было выделено 18 отдельных генотипов, причем проведенный анализ отражал принадлежность изолятов к виду *F. noatunensis* или *F. philomiragia*, подвиду *F. noatunensis* subsp. *orientalis,* либо *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* и более мелким внутриподвидовым группам, коррелируя в большинстве случаев с географической локализацией места выделения исследуемых штаммов. При исследовании 91 изолята *F. noatunensis* subsp. *noatunensis*, выделенных из трески на рыбных фермах в Норвегии, S. Duodu с соавт. с использованием 5 VNTR-локусов, 4 из которых идентичны описанным в предыдущей работе, позволило выявить 13 отдельных MLVA-профилей, разделив их на 3 основных группы [183].

Для типирования туляремийного микроба также применяется метод полиморфизма единичных нуклеотидных замен – SNP. При анализе SNP оценивают вариабельность единичных нуклеотидов определенного локуса бактериального генома. Если замена нуклеотида не приводит к замене кодируемой аминокислоты, мутация считается синонимической, а если приводит – несинонимической. Множество таких замен (особенно синонимических) может не оказывать влияния на жизнеспособность бактерии и, следовательно, сохраняться в геноме, что позволяет использовать их для оценки микроэволюции близкородственных изолятов, особенно при

одновременной оценке полиморфизма нуклеотидов нескольких локусов. В отличие от MLST, при котором оценивают вариабельность достаточно консервативных генов "домашнего хозяйства", при SNP-типировании анализируют локусы генов с высокой степенью полиморфизма [199]. Штаммовые генотипы, определенные по SNP, могут быть легко проанализированы в филогенетическом и популяционно-генетическом контексте, что позволяет отнести неизвестные штаммы к хорошо известным кластерам, выявить тесно связанные субклоны конкретного штамма и изучить распространенность определенного аллеля в популяции близкородственных штаммов, которые могут, в свою очередь, коррелировать с фенотипическими признаками инфекционного агента [137].

Для анализа филогенетических связей внутри вида *F. tularensis* была проведена работа по поиску в геноме *F. tularensis* потенциальных SNP по отношению к референсным штаммам (LVS и SCHU S4) и использованию их для филогенетического анализа 40 штаммов возбудителя туляремии [374]. При этом исследуемые штаммы разделялись по подвидам и по кластерам внутри подвидов. Однако, значительное число проанализированных для этого SNP – до 12407 – значительно затрудняет проведение рутинного анализа. Vogler A. J. с соавторами [472] на основе анализа 13 последовательностей геномов из 3000 SNP отобрали 23, обеспечивающих отнесение исследуемого штамма к определенной филогенетической группе. Этот набор SNP был использован для типирования коллекции из 496 изолятов *F. tularensis*, при этом было показано, что предлагаемый подход представляет собой превосходное средство отслеживания происхождения и распространения этого патогена в глобальном масштабе. Полученные результаты авторы дополнили данными MLVA анализа по 11 локусам. Как и в работе A. Johansson [274], в пределах *F. tularensis* subsp. *tularensis* было выявлено 2 отдельных субпопуляции и определена дополнительная структура внутри этих групп. Интересным представляется распределение по подгруппам изолятов *F. tularensis* subsp. *holarctica* – среди 11 субкладов внутри этого подвида был выделен 1 новый, генетически

занимающий промежуточное положение между *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *holarctica* bv. japonica. Проведенный анализ дает основание предположить североамериканское происхождение *F. tularensis* subsp. *holarctica* и объяснить распространение его в Евразии результатом нескольких неодновременных случаев миграции.

В работе K.A Svensson [443] было проведено множественное выравнивание геномов *F. tularensis* и отдельных генов, что позволило отобрать 23 канонические SNP (canSNP) и 11 так называемых канонических мутаций вставки-удаления (canINDEL), обеспечивающих дискриминацию на уровне отдельного изолята. При этом тест-система, основанная на применении этих маркеров, была адаптирована для RT-PCR, что значительно сокращает время анализа. Полученные при этом данные коррелировали с результатами MLVA-типирования для данных штаммов, проведенного по схеме, предложенной A. Johansson [274]. В отличие от других RT-PCR тест-систем, которые, как правило, предназначены для обнаружения конкретных видов, подвидов или штаммов, этот тип анализа может быть легко адаптирован для обеспечения соответствующего филогенетического и/или географического анализа.

В работе A. Sjödin [424] при изучении SNP были определены филогенетические связи всех известных видов рода *Francisella*, в том числе, с невыясненным ранее филогенетическим положением, и некоторых родственных микроорганизмов, не включенных в этот род. Согласно полученным данным род *Francisella* можно разделить на две основные генетические группы: в одну входит *F. tularensis*, *F. novicida*, *F. hispaniensis* и *Wolbachia persica*, а в другую - *F. philomiragia* и *F. noatunensis*. При этом было установлено, что лишь *F. tularensis* (типы A и B) и *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* характеризуются клональной структурой популяции.

Таким образом, как отмечает A. Johansson (рисунок 1), методами, позволяющими провести дискриминацию до отдельного штамма, являются полное секвенирование генома, до сих пор остающееся сложным и затратным, и метод MLVA [273, 274]. Более того, MLVA используется для сравнения

качества дискриминации изолятов [473]. Для повышения дискриминационной способности его можно использовать в комбинации с другими методами типирования, такими, как анализ SNP [472] и анализ маркеров с делециями/вставками (INDEL) [304]. В связи с этим для оценки генетического разнообразия *F. tularensis* из нашей колекции, состоящей из штаммов, относящихся к различным подвидам и имеющих различное географическое происхождение, мы использовали метод MLVA, как обладающий высокой разрешающей способностью и сравнительно легкий в воспроизводстве.

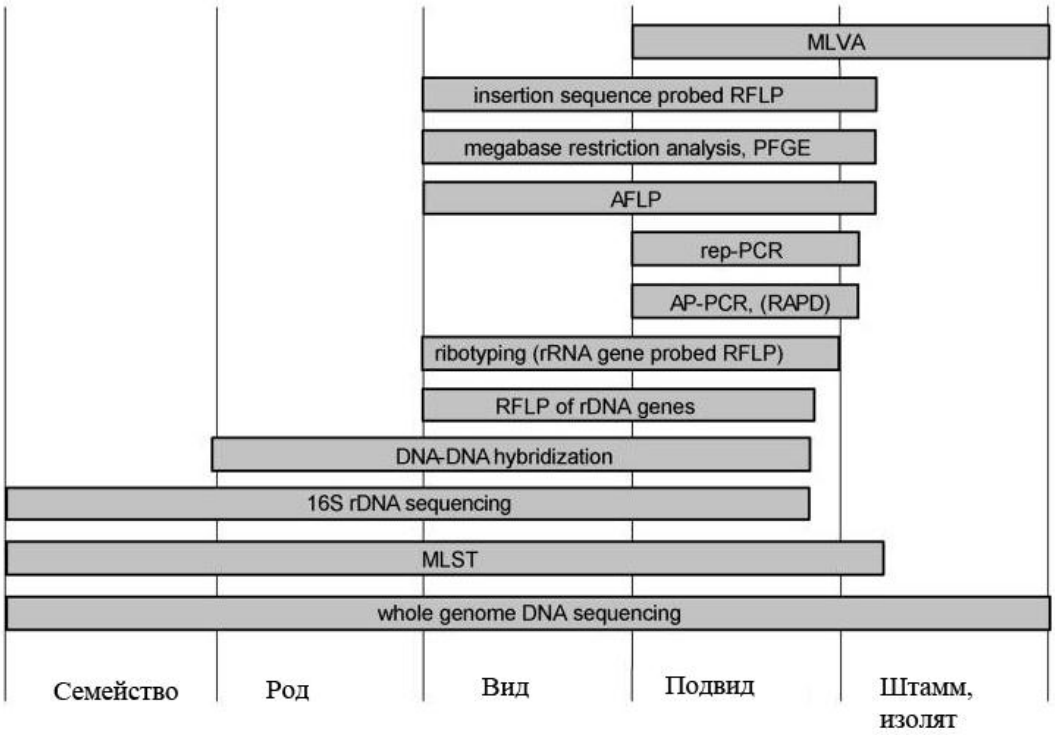


Рисунок 1 - Относительная разрешешающая способность различных методов ДНК-типирования [273].

1.3.3. Генетические основы биохимических различий подвидов *F. tularensis*

Обращает на себя внимание то, что большая часть генетических методов, применяемых для подвидовой диагностики, основана на анализе распределения генетических мишеней либо не имеющих функционального значения для микроорганизма, либо с невыясненной функцией. Кроме того, зачастую их

трудоемкость несколько снижает преимущества молекулярно-генетических методов анализа над традиционными биохимическими. В связи с этим представляется актуальным поиск генетических мишеней, которые присутствовали бы лишь у одного из подвидов и, желательно, имели бы определенное фенотипическое проявление. С этой целью нами была поставлена задача проанализировать возможность выявления таких мишеней среди генов, потенциально кодирующих ферменты, определяющие биохимические различия подвидов туляремийного микроба.

β-лактамазная активность *F. tularensis* является одним из основных диагностических признаков для дифференциации среднеазиатского подвида, так как это единственный подвид туляремийного микроба, не обладающий ею.

Бета-лактамазная активность микроорганизмов определяется ферментами, способными расщеплять бета-лактамное кольцо антибиотиков и потому названными бета-лактамазами. Бета-лактамазы, присутствующие в геноме большинства патогенных микроорганизмов, тесно связаны с понятием антибиотикорезистентности.

Открытие антибиотиков явилось одним из самых важных открытий в истории терапевтической медицины, позволившим спасти огромное количество жизней. Эпоха антибиотиков началась в 1929 г., когда Александр Флеминг опубликовал свои наблюдения об ингибировании роста *Staphylococcus aureus* на чашке с агаром, загрязненной *Penicillium notatum* [205]. Три года спустя было показано, что ингибирование роста было обусловлено действием вещества, названного пенициллином [150]. Первые клинические испытания пенициллина были предприняты в 1941 г. [100]. В 1945 г. Hodgkin и Low показали, что он относится к β-лактамам [170]. Более детально химическая структура пенницилина была изучена в середине 50-х годов, когда было установлено, что основой молекулы пенициллина является 6-аминопенициллановая кислота, состоящая из тиазолидинового и β-лактамного колец [405]. Модификация β-лактамного кольца путем присоединения боковых

цепей послужила отправной точкой для создания новых представителей данного класса антибиотиков (рисунок 2).

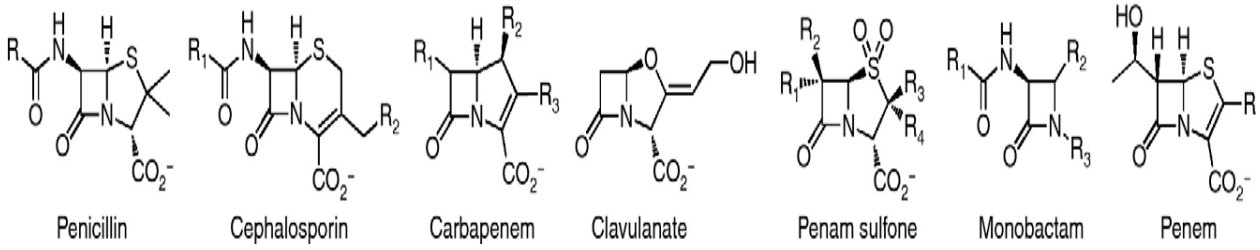


Рисунок 2 - Модификация структуры β-лактамного кольца путем присоединения боковых цепей. [405].

В течение следующих лет широко применялись природные, синтетические и полусинтетические β-лактамы, включая цефалоспорины, карбапенемы, клавуланат, монобактамы и пенемы.

Однако микробы существуют на Земле более 3,5 миллиардов лет и, возможно, являются самыми приспособленными организмами на нашей планете. Будучи неспособными к размножению половым путем, бактерии приобрели несколько дополнительных механизмов горизонтального обмена генетической информацией, которые позволили им заселить самые «негостеприимные» места обитания на Земле. Поэтому неудивительно, что, сталкиваясь с воздействием враждебных химических веществ – антибиотиков, они нашли, что им противопоставить [445]. Так, еще до начала клинического применения пенициллина, медицина столкнулась с проблемой устойчивости к нему микроорганизмов – первое сообщение об обнаружении штамма *E. coli*, резистентного к пенициллину, датируется 1940 г. Тогда же было установлено, что причиной устойчивости этой грамотрицательной бактерии к пенициллину является ее способность образовывать разрушающие антибиотик ферменты [101]. Подобные ферменты были названы β-лактамазами. Согласно определению Комитета по номенклатуре Международного биохимического общества, β-лактамазы классифицируются как «ферменты, осуществляющие гидролиз амидов, амидинов и других C–N связей, выделенные на основании субстрата – циклических амидов» [477.]

β-лактамазы представляют обширную группу генетически и функционально различных ферментов, отличающихся способностью разрушать β-лактамные антибиотики, тем самым обеспечивая устойчивость к ним бактерий-продуцентов. Природная способность к продукции β-лактамаз характерна для многих видов микроорганизмов.

Разнообразие β-лактамаз определяется:

– субстратной специфичностью, то есть способностью к гидролизу определенных групп β-лактамов – пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов, карбапенемов,

– чувствительностью к действию ингибиторов,

– локализацией кодирующих их генов (хромосомная или плазмидная),

– особенностью структуры белковой молекулы.

Перечисленные особенности послужили основой создания различных систем классификации β-лактамаз.

Первая система классификации, которую создал P.C. Fleming, учитывала лишь способность к гидролизу пенициллинов или цефалоспоринов [205]. T. Sawai была предложена реакция с имунными сыворотками, как дополнительный признак для классификации [414].

M.H. Richmond и R.B. Sykes разделили все известные в начале 70-х годов β-лактамазы грамотрицательных микроорганизмов на 5 групп с учетом субстратного спектра, чувствительности к ингибиторам и локализации кодирующих генов [401]. В 1976 г. эта классификация была дополнена R.B. Sykes и M. Matthew [446]. В схеме S. Mitsuhashi и M. Inoue была выделена дополнительная группа «цефуроксим-гидролизующих» ферментов [348]. Предложенная R. Ambler в 1980 г. схема классификации учитывала особенности первичной структуры β-лактамаз. Так, были выделены: молекулярный класс А – в активном центре ферментов расположен остаток серина, и молекулярный класс В – металло-β-лактамазы, в активном центре которых расположен ион цинка [104]. Позже были описаны два дополнительных класса ферментов, содержащих серин в активном центре:

класс C – цефалоспориназ, и класс D – оксациллиназ грамотрицательных бактерий [135]. В последнее время значение структурной классификации возросло в связи с расширением использования молекулярных методов диагностики и типирования β-лактамаз.

Прообразом современной классификации явилась предложенная K. Bush в 1989 г. система разделения β-лактамаз на 3 основные группы, в которой впервые предпринята попытка провести корреляцию между функциональными особенностями (спектром активности, чувствительностью к ингибиторам) и молекулярной структурой ферментов, продуцируемых различными видами микроорганизмов. Эта система была уточнена и дополнена в 1995 г. K. Bush, G. Jacoby и A. Medeiros с учетом новых ферментов, описанных у энтеробактерий, и в настоящее время принята большинством исследователей [322]. Ниже приведена классификация β-лактамаз по Bush K. [135] и связь ее с классификационными схемами, предложенными ранее (таблица 7)

Таблица 7 - Классификация β-лактамаз по Bush K. [135]

Bush-Jacoby-Medeiros group	1989 Bush group (44)	Richmond-Sykes class (253)	Mitsuhashi-Inoue type (194)[a]	Molecular class (2, 121, 132)	Preferred substrates	Inhibited by: CA[b]	Inhibited by: EDTA	Representative enzymes
1	1	Ia, Ib, Id	CSase	C	Cephalosporins	−	−	AmpC enzymes from gram-negative bacteria; MIR-1
2a	2a	Not included	PCase V	A	Penicillins	+	−	Penicillinases from gram-positive bacteria
2b	2b	III	PCase I	A	Penicillins, cephalosporins	+	−	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2b′	Not included except K1 in class IV	CXase	A	Penicillins, narrow-spectrum and extended-spectrum cephalosporins, monobactams	+	−	TEM-3 to TEM-26, SHV-2 to SHV-6, *Klebsiella oxytoca* K1
2br	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins	±	−	TEM-30 to TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicillins, carbenicillin	+	−	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penicillins, cloxacillin	±	−	OXA-1 to OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	Ic	CXase	A	Cephalosporins	+	−	Inducible cephalosporinases from *Proteus vulgaris*
2f	Not included	Not included	Not included	A	Penicillins, cephalosporins, carbapenems	+	−	NMC-A from *Enterobacter cloacae*, Sme-1 from *Serratia marcescens*
3	3	Not included	Not included	B	Most β-lactams, including carbapenems	−	+	L1 from *Xanthomonas maltophilia*, CcrA from *Bacteroides fragilis*
4	4	Not included	Not included	ND[c]	Penicillins	−	?	Penicillinase from *Pseudomonas cepacia*

[a] Csase, cephalosporinase; PCase, penicillinase; CXase, cefuroxime-hydrolyzing β-lactamase.
[b] CA, clavulanic acid.
[c] ND, not determined.

Мишенью β-лактамных антибиотиков являются ферменты биосинтеза пептидогликана в клеточной стенке бактерий. Реакцию образования связи

между аминокислотными остатками пептидных мостиков и предпоследним остатком D-аланина боковых пептидов (транспептидирование) катализирует фермент транспептидаза, а необходимая для этого энергия выделяется при отщеплении конечных D-аланиновых остатков боковых пептидов. Бета-лактамные антибиотики действуют в качестве имитатора дипептида D-Ala-D-Ala в пептидогликане и образуют ковалентную ацильную связь с активным центром транспептидазы, необратимо ингибируя ее – ацилированный фермент стерически не способен к дальнейшей передаче ацильной группы. Поэтому транспептидазы и подобные им ферменты, участвующие в транспептидировании, называют также пенициллинсвязывающими белками. Подавляя синтез клеточной стенки, антибиотики вызывают гибель бактерий в результате осмотического лизиса, так как в их присутствии аутолиз клеточной стенки не уравновешивается процессами восстановления, и стенка разрушается эндогенными пептидогликангидролазами (аутолизинами), обеспечивающими ее перестройку в процессе нормального роста бактерий [145]

Высокая резистентность туляремийного микроба к β-лактамным антибиотикам давно известна [55]. Более того, отсутствие β-лактамазной активности, традиционно определяемое по способности расщеплять бензилпенициллин в присутствии индикатора крезолового красного, либо по реакции с хромогенным субстратом нитроцефином, используется для дифференцирования штаммов среднеазиатского подвида [351, 368].

Однако β-лактамазы *F. tularensis* были идентифицированы и описаны лишь после появления метода полногеномного секвенирования. В 2003 г. в исследовании [306], посвященном разработке метода целевой инактивации генов у туляремийного микроба на примере *F. tularensis* subsp. *novicida* U112, было показано, что при инактивации гена, кодирующего белок с 59 %-ным сходством с β-лактамазой класса А *Yersinia enterocolitica* и, предположительно, также являющегося β-лактамазой, не наблюдается увеличения чувствительности микроорганизма к ампициллину. Это заставило авторов предположить наличие у возбудителя туляремии других функционально

активных β-лактамаз. Позднее выявленные у штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS два гена β-лактамаз, названные *bla*A и *bla*B (*bla*A был аналогичен гену, описанному C.M. Lauriano), были проклонированы в *E. coli*. При этом было показано, что лишь один из этих генов (*bla*B) кодирует функционально активный белок, обеспечивающий резистентность к ампициллину [124]. Эти данные были подтверждены при делетировании соответствующих генов непосредственно у *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS – штамм с делетированным геном *bla*B показал чувствительность к ампициллину в концентрации 50 мкг/мл, причем устойчивость к ампициллину восстанавливалась при трансформации мутантного штамма плазмидой, несущей этот ген [324]. Также авторы отметили удобство использования полученного штамма с отсутствием лактамазной активности для генетических исследований, так как появляется возможность применения плазмид, несущих в качестве маркера гены устойчивости к ампициллину.

Более детально фермент, кодируемый геном *bla*B, был исследован в работе [109]. Он был назван авторами FTU-1. Низкий процент гомологии с другими β-лактамазами класса А, включая карбопенемазы, не превышающий 35,0 %, позволил отнести FTU-1 к отдельной группе сериновых β-лактамаз. Анализ последовательности гена показал, что открытая рамка считывания размером 864 п.о. кодирует 32,0 кДа белок, зрелая форма которого, предположительно, после процессинга будет иметь массу 30,1 кДа и pI 7,1. Он содержит консервативные домены ^{70}SXXK^{73}, ^{130}SDN^{132}, ^{166}EXXXN^{170} и ^{234}KTG^{236}, характерные для сериновых β-лактамаз, и два остатка цистеина (Cys 69 и Cys 238), характерные для всех карбопенемаз класса А [475] Это позволило предположить наличие у этого белка активности по отношению к карбапенемам. Исследование специфичности FTU-1 показало, что данная β-лактамаза, будучи проклонированной в *E. coli*, обеспечивает повышение устойчивости к антибиотикам пенициллинового ряда и цефтазидима (цефалоспорин 3-го поколения). Карбапенемазная активность при этом оказалась достаточно низкой. FTU-1 отличается от большинства β-лактамаз

класса узким спектром антибиотикорезистентности, не обеспечивая устойчивости к цефалоспоринам ранних поколений. Влияние FTU-1 на антибиотикорезистентность *E. coli* JM83 отображено в таблице 8.

Таблица 8 - Устойчивость к антибиотикам штамма *E. coli* JM83 с проклонированным в плазмиду pHF016 геном FTU-1. В качестве контроля взят тот же штамм, несущий исходную плазмиду без гена FTU-1.

Антибиотик	МПК (мкг/мл)	
	Контроль	FTU-1
Бензилпенициллин	32	256
Ампициллин	2	256
Ампициллин/сульбактам	2	32
Амоксициллин	4	1,024
Амоксициллин /клавулоновая кислота	2	64
Оскациллин	128	512
Тикарциллин	2	1,024
Тикарциллин/ клавулоновая кислота	2	256
Пиперациллин	2	64
Пиперациллин /тазобактам	2	32
Цефалотин	4	4
Цефуроксим	1	1
Цефтазидим	0,125	0,5
Цефотаксим	0,031	0,031
Цетриаксон	0,031	0,031
Цефепим	0,031	0,031
Цефокситин	2	2
Цефметазол	0,5	1
Моксалактам	0,25	0,25
Азтреонам	0,063	0,063
Имипенем	0,125	0,25
Меропенем	0,031	0,031
Эртапенем	≤0,008	≤0,008
Дорипенем	0,031	0,031

Следует отметить, что аналоги FTU-1 были обнаружены авторами у всех четырех подвидов туляремийного микроба (включая *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*). Это согласуется с отсутствием подвидовых различий в устойчивости к β-лактамным антибиотикам [95], однако при этом остается невыясненным отсутствие лактамазной активности в отношении бензилпенициллина и нитроцефина у подвида *mediasiatica*.

Также, кроме вышеупомянутых генов, к моменту начала нашей работы в аннотированные геномы базы NCBI была внесена еще одна β-лактамаза класса B (металло-β-лактамаза) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/511).

Следует отметить, что роль генов *bla*A, *bla*B, а также гена вышеупомянутой металло-β-лактамазы, равно как и других, не выявленных на данный момент лактамаз в обеспечении устойчивости туляремийного микроба к другим группам β-лактамов, остается малоизученной и недостаточно охарактеризованной. Первоочередной интерес представляет нерешенный вопрос о наличии внутривидовых различий по признаку β-лактамазной активности и их генетических основах, как потенциальных мишеней для ПЦР-дифференциации среднеазиатского подвида возбудителя туляремии.

1.4.Туляремийные вакцины

1.4.1. История создания и использования живой туляремийной вакцины

Планомерное изучение туляремии в СССР началось с 1926 – 1930 гг. Советскими исследователями получено много важных научных данных об этиологии, эпидемиологии, диагностике, клинике и терапии этого заболевания. В это время в нашей стране проводилась интенсивная работа по созданию вакцины против этого инфекционного заболевания, результатом которой было получение Н.А. Гайским в 1945 г. живой туляремийной вакцины. Аттенуирование вакцинного штамма *F. tularensis* 15 было достигнуто в результате многократных пассажей природного изолята на питательной среде, содержащей нормальную сыворотку [286]. Первое сообщение о вакцинном штамме *F. tularensis* «Москва», использованном для вакцинации людей, появилось в 1941 г. [57]. Эффективность этой вакцины была продемонстрирована на добровольцах [57]. В последующем этими же авторами был получен штамм *F. tularensis* 15, который был практически авирулентным для морских свинок, но сохранил определенную вирулентность для мышей. Этот штамм был использован без существенных побочных последствий как для внутрикожно/подкожной, так и для интраназальной вакцинации людей [57].

Вакциной, приготовленной из бактерий штамма *F. tularensis* 15, до 1960 г. было привито более 60 млн. человек [428]. Однако штамм *F. tularensis* 15 оказался нестабильным – со временем он потерял вирулентность для мышей [57, 388]. Ослабленный штамм после пассирования через животных восстановил протективные свойства и в результате был получен штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ (восстановленный) [18].

Штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, на основе которого производится используемая в настоящее время туляремийная вакцина, авирулентен для человека и обладает сниженной вирулентностью для мелких грызунов [55]. Вакцинация людей живым вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ приводит к формированию специфического и длительного гуморального и клеточного иммунитета. Такой иммунитет формируется у людей, переболевших туляремией [55]. Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, обладая остаточной вирулентностью и примерно тем же антигенным составом, что и вирулентные культуры, хорошо иммунизирует человека и животных, в том числе белых мышей и морских свинок. Но накопление антител идет на более низком уровне, а длительность иммунитета несколько меньшая, чем у переболевших [55]. LD_{50} применяемого ныне вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ для мышей составляет 800 КОЕ. Выжившие мыши практически не восприимчивы к туляремийной инфекции и в 97 % противостоят подкожному заражению 1000 смертельных доз вирулентного штамма голарктического подвида. У людей штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ обеспечивает высокую прививаемость и иммуногенность при относительно невысокой реактогенности. Через 1 год после вакцинации иммунитет (по кожной аллергической реакции) сохраняется у 91 % привитых [55]. Учитывая, что кожная проба на тулярин и титр специфических сывороточных антител сохранялся у иммунизированных людей в течение 5 лет после иммунизации, был установлен 5-летний интервал между вакцинациями для эндемичных по туляремии районов Советского Союза [56]. Недостатком туляремийного вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (восстановленного) является нестабильность, выражающаяся в R-S

диссоциации, приводящая к снижению иммуногенности [194] и некоторая степень реактогенности, особенно для людей со сниженным иммунитетом.

В 1956 г. лиофильно высушенная культура штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ была передана в США [408]. При высеве бактериальной культуры из ампул было получено два типа колоний – голубые и серые [408]. Один из клонов голубых колоний послужил основой для получения вакцинного штамма LVS (Live Vaccine Strain) [194]. Мыши и морские свинки, иммунизированные бактериальной культурой *F. tularensis* LVS, полученной из голубых колоний, были эффективно защищены от последующего аэрозольного заражения *F. tularensis* Schu S4 в дозе 10 DCL [187].

У обоих вакцинных штаммов – *F. tularensis* 15 НИИЭГ и LVS - аттенуация генетически не детерминирована, поскольку достигнута путем многочисленных пассажей на синтетических средах. Недавно было показано, что в ЛПС клеточной капсулы бактерий штамма *F. tularensis* LVS отсутствует галактозамин-1-фосфат, присутствующий в природных изолятах *F. tularensis* subsp. *holarctica* [386], что, возможно, обусловливает сниженную вирулентность штамма LVS.

1.4.2. Сравнительная характеристика эффективности туляремийных вакцин

В качестве наиболее ранних вакцинных препаратов против туляремии применяли инактивированные теплом и формалином культуры туляремийного микроба – так называемые «грубые» экстракты [212]. Созданная по такому принципу вакцина Фоши защищала обезьян от гибели при заражении вирулентным штаммом *F. tularensis* Schu S4 subsp. *tularensis* (740 КОЕ) [163], однако животные при вакцинации проявляли все симптомы туляремии (местный некроз, региональная лимфоаденопатия). Сходная картина наблюдалась и у мышей, что было обусловлено значительной реактогенностью вакцины Фоши. Кислотная экстракция убитых клеток позволила получить препарат с меньшей реактогенностью. Однако такая вакцина защищала от возбудителя туляремии подвида *tularensis* только частично как при

внутрикожном, так и при аэрозольном заражении [412, 413]. Тем не менее вакцинация людей вакциной из убитых клеток приводила к снижению числа случаев заболевания туляремией и к более легкому течению заболевания [278].

Инактивация бактерий *F. tularensis* радиацией не улучшала протективные свойства получаемых препаратов по сравнению с вакциной Фоши [237]. Работы в этом направлении проводятся и в настоящее время. Исследователи пытаются усилить эффект препаратов из убитых бактериальных клеток, комбинируя их с такими адьювантами, как гидроокись алюминия, иммуностимулирующие комплексы (ISCOMs) или олигонуклеотиды CpG, получая некоторый протективный эффект против вирулентных штаммов типа B и типа A [200]. Используя протеомный микроэррейный анализ, был определен спектр антител, продуцируемых при вакцинации убитой вакциной в комплексе с адьювантами. Убитая вакцина LVS с такими адьювантами, как алюминий и CpG, стимулировала выработку антител того же профиля, что и убитая LVS вакцина без адьювантов, но титр антител был значительно выше, протективный эффект наблюдали при интрадермальном заражении вирулентным штаммом типа B, а при заражении штаммом Schu S4 (тип A) защита была незначительной. Неспособность препаратов убитых бактериальных клеток индуцировать у лабораторных животных и у людей напряженный и длительный протективный иммунитет, вероятно, связана с низким уровнем индукции клеточного звена иммунитета, формируемого после вакцинации такими препаратами.

Кроме убитых клеток в качестве вакцины против туляремии разрабатывалась химическая субъединичная вакцина на основе протективных антигенов туляремийного микроба. Среди них особое место занимает ЛПС, который индуцирует хороший антительный ответ и защищает лабораторных животных от низковирулентных штаммов *F. tularensis* [219, 220], но не предохраняет от заражения высоковирулентными штаммами *F. tularensis* subsp. *tularensis* [161, 219] и subsp. *holarctica* [94]. Подкожное введение ЛПС, полученного из штамма LVS *F. tularensis*, лишь частично защищало мышей от аэрозольного заражения этим же штаммом, увеличивая время жизни мышей не

более, чем на 2 дня [161]. Это позволяет считать, что гуморальный иммунитет при туляремийной ифекции играет второстепенную роль [450]. Низкая активность ЛПС может быть усилена другими компонентами бактерий, например, белком GroEL [364].

На основе компонентов клеточной стенки бактерий *F. tularensis* был создан «С»-комплекс *F. tularensis*, состоящий из стабильных надмолекулярных структур с молекулярной массой более 200 кДа [20]. «С»-комплекс, приготовленный из бактерий штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и состоящий из белков, липидов и углеводов в соотношении 2 : 1 : 1, защищал беспородных белых мышей от гибели при заражении штаммами *F. tularensis* subsp. *holarctica* и при этом он не был токсичным, пирогенным и не повреждал иммунокомпетентные клетки лабораторных животных [9].

Подкожная иммунизация морских свинок препаратом из внешней мембраны штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ или A'Cole защищала животных от последующего заражения дозой 1000 DCL штамма *F.tularensis* 503 через один месяц [93]. Данный препарат внешней мембраны состоял из 12-20 % белков с молекулярной массой 15, 17 и 19 кДа, 15-30 % углеводов и до 40 % липидов. Белок 17 кДа преобладал среди белков этого комплекса [94].

Ряд белков туляремийного микроба - 17 кДа липопротеин, 43 кДа белок внешней мембраны и белок теплового шока 60 кДа реагировали с Т-лимфоцитами людей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* LVS или переболевших туляремией [442, 427]. Однако эти очищенные белки обладали слабой протективной активностью на мышиной модели экспериментальной туляремии [248].

Субъединичные вакцины, как и убитые бактерии, индуцируют преимущественно гуморальный ответ и не способны вызывать выработку необходимого клеточного иммунного ответа [450]. Одна из причин неэффективности вакцинации данными вакцинами является то, что *F. tularensis* – внутриклеточный микроорганизм, и только клеточно-опосредованный иммунитет может обеспечивать защиту макроорганизма от патогена.

Недостаточная эффективность растворимых вакцинных препаратов связана с существенной ролью Т-лимфоцитов памяти в формировании поствакцинального иммунного ответа против *F. tularensis*. Как показали исследования, антительный ответ макроорганизма был протективен только при заражении низковирулентными штаммами *F. tularensis* [179, 400]. Для защиты от заражения высоковирулентными штаммами *F. tularensis* необходимо формирование специфического пула иммунных Т-лимфоцитов памяти [450].

Клеточный иммунитет является ключевым звеном в протективном защите от вирулентных туляремийных штаммов, тогда как гуморальный ответ защищает против штаммов со сниженной вирулентностью [115, 333]. Как известно, клеточно-опосредованный Т-лимфоцитарный ответ не формируется растворимыми антигенами, входящими в состав субъединичных вакцин. Для его формирования необходима презентация антигенов иммунной системе в комплексе с молекулами МНС I класса, что возможно только при определенной доставке антигенов в антиген-презентирующие клетки (АПК), имитирующей внедрение внутриклеточного патогена в клетки макроорганизма.

Для обеспечения адекватной доставки антигенов в АПК в состав субъединичных вакцин, так же, как и вакцин на основе убитых бактерий, вводят адьюванты, такие, как стимулирующие иммунные комплексы (ISCOMS) и олигонуклеотидные последовательности CpGs [201.], либо используют системы доставки на основе векторов из других внутриклеточных патогенов [271]. Однако такие вакцинные препараты также не формируют достаточно напряженного специфического иммунитета. Они эффективны для ревакцинации и могут использоваться на фоне экстренной профилактики антибиотиками. Кроме того, вакцины, сконструированные на основе одного-двух индивидуальных иммунодоминантных антигенов, не могут обеспечить защиту от всех серологически отличающихся вирулентных вариантов возбудителя инфекции.

Использование живых вакцин, сконструированных на основе аттенуированных штаммов, обеспечивает индукцию полноценного иммунного

ответа не только против одного-двух иммунодоминантных, но против целого спектра сложных (комплекс белка с ЛПС и т.п.) и минорных антигенов, способного защитить макроорганизм от патогенных бактерий даже с частично измененной антигенной специфичностью. На настоящий момент известны два вакцинных штамма: в России – применяемый в настоящее время вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, в США и странах Западной Европы – штамм *F. tularensis* LVS, вакцинация которыми приводит к формированию напряженного иммунитета против туляремии [461]. У людей специфический Т-клеточный ответ к *F. tularensis* может сохраняться в течение долгого времени, по данным некоторых исследователей, более 25 лет [198]. Созданная живая туляремийная вакцина обеспечивает наиболее успешную защиту от этого заболевания, являясь одним из немногих примеров эффективных вакцин, разработанных против внутриклеточных паразитов.

Иммунитет, созданный живой туляремийной вакциной, наиболее полно изучен за рубежом для штамма *F. tularensis* LVS. Данная вакцина не лицензирована и используется в США и странах Западной Европы только в качестве экспериментальной вакцины [133], однако возможность использования высоковирулентных штаммов возбудителя туляремии как агента для биотерроризма [188], актуальность этих исследований очевидна. Спектр таких исследований расширяется с увеличением технических возможностей исследователей и позволяет более полно характеризовать иммунопатогенез этого инфекционного заболевания.

1.4.3. Иммунные реакции макроорганизма при введении живой туляремийной вакцины

Большинство существующих вакцин направлено против внеклеточных бактериальных патогенов. Вакцина в таком случае способствует продукции специфических антител, которые мешают развитию инфекционного процесса путем нейтрализации экзотоксинов, запускают каскад комплемента, а также опсонизируют патоген для обеспечения успешного фагоцитоза и уничтожения бактерий нейтрофилами или макрофагами. Все это неэффективно против

внутриклеточных патогенов, когда требуется клеточно-опосредованный иммунный ответ для уничтожения болезнетворного агента. В настоящее время широко используются еще две вакцины против внутриклеточных инфекций – живая BCG вакцина против туберкулеза и живая вакцина Ty21a против брюшного тифа [158].

Живая туляремийная вакцина, как указывалось выше, имеет ограниченное применение в США из-за отсутствия лицензирования, а в России – из-за некоторого снижения эпидемиологического контроля. Тем не менее, возможность применения живой туляремийной вакцинной в случае острой необходимости (например, при биотеррористической угрозе [188]) требуют детального изучение механизмов формирования иммунитета при вакцинации [373].

Формирование поствакцинального и постинфекционного иммунитета происходит в два основных этапа. Первый – это реакция врожденного иммунитета на внедрение инфекционного агента, в нашем случае – типичного внутриклеточного патогена. Второй этап – это формирование адаптивного специфического иммунитета, который обеспечивается специфическими антителами и специфическими клетками памяти – $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитами с фенотипом $CD45RA^{-/+}$, $CD62^-$ [407]. Существует мнение, что при вакцинации живой вакциной формируется нестерильный иммунный ответ [73]. Поскольку патогенез вакцинного и инфекционного процессов зависит от степени вирулентности изучаемых штаммов, то для создания новых вакцинных штаммов необходимо детальное изучение изменений в геноме, приводящих к снижению вирулентности туляремийного микроба.

Работы по изучению механизмов вирулентности *F. tularensis* проводились, в основном, на культуре макрофагов, однако последние работы показывают, что и другие типы фагоцитирующих клеток, такие, как нейтрофилы и дендритные клетки, а также и не фагоцитирующие клетки – гепатоциты и эндотелиальные клетки – способны колонизироваться

туляремийным микробом [154, 208, 340]. Роль различных типов клеток в развитии туляремийной инфекции еще предстоит изучить.

Наиболее подробно изучена способность туляремийного микроба размножаться внутри профессиональных фагоцитов [154, 234]. Показано, что мутанты с нарушенной способностью к внутриклеточному размножению обладают и сниженной вирулентностью [122]. После проникновения в макрофаг *F. tularensis* остается в фагосоме [108, 211], так как бактериальная клетка способна тормозить созревание фагосомы, которая приобретает маркеры ранней и поздней эндосомы, но без катепсина D. Для процесса торможения биогенеза фагосомы необходим транскрипционный регулятор MglA острова патогенности *F. tularensis* [411]. После захвата бактерии фагосомальные частицы созревают и переходят в раннюю эндосому, имеющую pH 6.5, затем в позднюю эндосому. Не закисленная фагосома, содержащая *F. tularensis*, не сливается с лизосомой, оставаясь стабильной в течение 2-4 ч, а затем мембрана фагосомы разрушается и микроб выходит в цитоплазму инфицированной клетки, где и начинает размножение [233].

Выход из фагосомы инфицированной клетки организма-хозяина является существенным отличием высоковирулентного штамма *F. tularensis* subsp. *tularensis* от низковирулентного штамма *F. tularensis* subsp. *novicida* [307, 317, 359, 411, 463]. Разрушение фагосомы зависит от экспрессии специфичного белка 23 кДа IglC (intracellular growth locus) [307, 317, 411]. Точная функция данного белка не установлена, но его экспрессия усиливается при росте в макрофагах *in vitro* и в селезенке мыши *in vivo* [236, 465]. Нарушение экспрессии данного белка приводит к полной потере вирулентности штамма [233, 305, 307, 317, 463]. Белок IglC является компонентом «острова патогенности», который включает в себя белки IglA-D, PdpA и PdpD, которые регулируются *mgl*A и *mgl*B (macrophage growth locus) генами [359, 411].

При создании живой аттенуированной вакцины для туляремии очень важно учитывать способность туляремийного микроба переходить из фагосомы

в цитоплазму. Мутанты, неспособные высвобождаться из фагосомы, например, с нарушенной экспрессией белка IglC, имеют сниженную вирулентность и не индуцируют протективный иммунитет против заражения вирулентным штаммом [307, 463]. Выход из фагосомы важен также для процессинга и высвобождения цитокина IL1-β, инициирующего воспалительный процесс, и для презентации антигенов комплекса гистосовместимости (MHCI) [223, 310]. Таким образом, выход микроорганизмов из фагосомы в цитозоль важен и для активации врожденной иммунной системы распознавания в организме-хозяине, и для развития воспалительного процесса, который играет существенную роль в защите организма от внутриклеточного патогена.

Не все факторы вирулентности туляремийного микроба одинаково влияют на ключевой момент патогенеза туляремийной инфекции – взаимодействие патогена с макрофагом. Например, у мышей развитие инфекции имеет менее выраженный характер при делеции генов тип IV пили и *tolC*, при этом не влияет на способность к размножению в макрофагах [210, 228]. Бактерии *F. tularensis*, фагоцитированные нейтрофилами, способны блокировать респираторный взрыв [340], а наличие супероксиддисмутазы SodB защищает туляремийный микроб от губительного действия окислительного взрыва [112]. Размножение бактерий в макрофагах в конечном этапе приводит к апоптозу последних [240, 303, 307, 411], что позволяет патогену колонизировать новые клетки хозяина. Далее бактерии попадают в региональные лимфоузлы, печень и селезенку, вызывая клинические проявления заболевания.

Первые симптомы заболевания обусловлены реакцией врожденного иммунитета на инфицирование туляремийным микробом. У людей это выражается в виде лимфаденита возле места внедрения агента. При респираторном заражении лимфаденит может развиваться либо в легких, либо в верхних дыхательных путях при обязательном повышении температуры, которое связано, прежде всего, с продукцией провоспалительных цитокинов. Если для человека порой трудно установить время заражения и точно указать,

через какое время после внедрения агента развивается этот симптомокомплекс, то при моделировании этого процесса на животных показано, что это происходит через 48-72 ч.

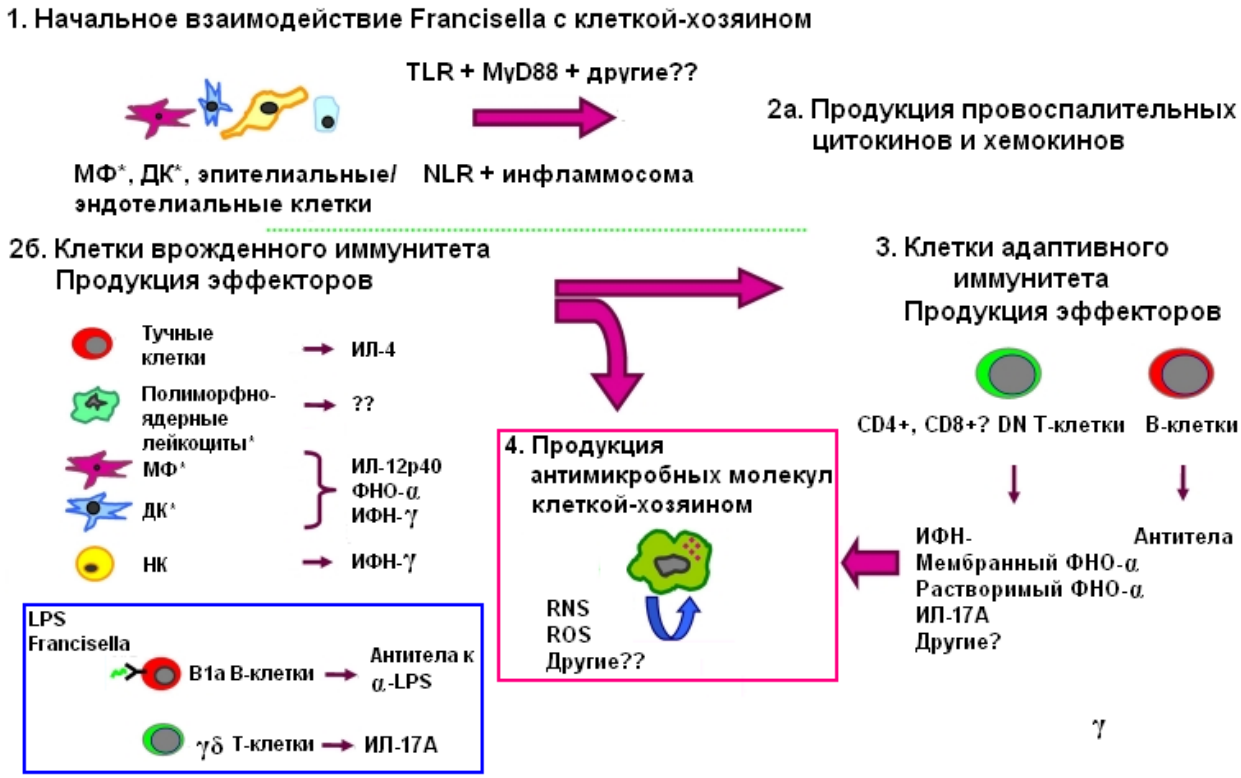


Рисунок 3 – Компоненты врожденного и адаптивного иммунного ответа мыши на *Francisella*.

Примечание: Звездочкой (*) показаны клетки-хозяева, которые содержат *Francisella.* В синей рамке указаны типы клеток, которые на основе классических определений не являются клетками только врожденного или адаптивного иммунитета [167].

Схема иммунного ответа мыши на заражение туляремией представлена на рисунке 3. Начальное взаимодействие (1) *Francisella* с клетками-хозяевами, такими, как макрофаги, дендритные клетки, эпителиальные клетки и эндотелиальные клетки, стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов (2a) посредством MyD88, TLR2, а также других неизвестных рецепторов, которые передают сигнал с помощью MyD88. Связывание бактериальной ДНК с NOD-подобными рецепторами (NLR) AIM2 также может иметь решающее значение для сборки инфламмасом и высвобождения IL-1β. Одновременно с этим клетки врожденного иммунитета привлекаются в область инфекции для продукции эффекторных цитокинов,

таких, как IL-12p40, TNF-α, IFN-γ и IL-17A (2б), которые влияют на развитие Т-клеток (3) и вызывают продукцию противомикробных молекул клеткой-хозяином (4) [152, 167].

В дополнение к классическим цитокинам Th1-типа, другие медиаторы стимулируют тучные клетки к выработке IL-4, который может непосредственно ингибировать рост *Francisella* внутри макрофагов, а В-клетки – вырабатывать антитела к LPS, которые ограничивают развитие инфекции. Полиморфоядерные лейкоциты имеют важное значение для выживания *Francisella* при некоторых способах заражения, но теряют способность уничтожать внутриклеточные организмы *in vitro,* так что их вклад в развитие инфекции остается неясным.

Через несколько дней после заражения туляремией происходит активация и увеличение количества специфических Т- и В-клеток. αβ Т-клетки играют важную роль для элиминации первичной инфекции; они продуцируют эффекторные цитокины, такие как IL-17A и гамма-интерферон, а также связанные с мембраной и растворимые формы ФНО-α [173, 174, 335]. Эти факторы, предположительно, усиливают и продлевают активацию инфицированной клетки-хозяина для ограничения внутриклеточного роста *Francisella* с помощью продукции активных форм кислорода и промежуточных продуктов азота, а также с помощью других неизвестных противомикробных продуктов [318, 319].

Через 2-4 суток при респираторной инфекции обнаружено повышение уровня мРНК гамма-интерферона и фактора некроза опухолей (ФНО) [107], цитокинов IL-6 и IL-1β (на 3-4 день) в отдаленных органах (печени и селезенке) и в сыворотке [162]. Многие исследования подтверждают, что повышение уровня провоспалительных цитокинов в ранние сроки после заражения реакция организма направленны на уничтожение возбудителя, хотя повышение провоспалительных цитокинов до черезвычайно высоких уровней может приводить к обратному эффекту и даже к смерти. Например, введение мышам синтетических TLR4, TLR3 или рекомбинантного IL-12 перед заражением

туляремией вызывало снижение высеваемости бактерий из органов и увеличение выживаемости животных [181, 313, 392]. Чрезмерная продукция провоспалительных цитокинов («цитокиновый шторм») приводят к нарушению сосудистой проницаемости, разрушению тканей и поражению органов. Одним из медиаторов септического состояния является ядерный ДНК-связывающий белок HMGB-1, продукция которого зависит от возраста животных – чем старше мыши, тем менее вероятно развитие гиперцитокинемии, которая может привести к септическому процессу с летальным исходом [167].

Показано, что продукция цитокинов зависит от степени вирулентности заражающих штаммов. Вирулентные штаммы вызывают супрессию продукции цитокинов, что обуславливает подавление иммунного ответа и успешное развитие инфекции. Например, мыши, дефицитные по синтезу гамма-интерферона, ФНО, лимфотоксина, iNOS гораздо чувствительнее к инфекции, чем мыши без иммунодефицита [146, 491]. В отличие от высоковирулентных штаммов, при введении низковирулентного штамма LVS только мыши, лишенные классических Th1 цитокинов (гамма-интерферона, ФНО) были чувствительны ко всем заражающим дозам этого вакцинного штамма [192, 193]. Мыши, дефицитные по любому из этих цитокинов, погибали в первую неделю после заражения, что подтверждает важность реакции врожденного иммунитета и критическую роль гамма-интерферона и ФНО для выживания [167]. Следует отметить, что IL-1240p и его гетеродимер IL-23 позитивно регулируют продукцию гамма-интерферона [134].

В то же время Th2 цитокины, в частности IL-4, не столь важны при развитии инфекции. Мыши, обработанные антителами к IL-4 при интрадермальном заражении штаммом LVS были одинаково чувствительны к инфицированию, как и мыши контрольной группы [312]. При интраназальном заражении и развитии легочной формы заболевания нокаутные по IL-4 мыши были незначительно чувствительнее [285], в то время как нокаутные по IL-10 мыши становились очень чувствительны к данной инфекции [343].

Продукция провоспалительных цитокинов на первых этапах инфицирования является результатом взаимодействия клеток врожденного иммунитета – фагоцитирующих (нейтрофилы, макрофаги-моноциты и дендритные клетки) и не фагоцитирующих (тучные клетки и натуральные киллеры) – с бактериальными клетками *F. tularensis*. Это, своего рода, неспецифическая иммунная защита от патогена. Однако для внутриклеточных микроорганизмов протективная поствакцинальная или постинфекционная защита обеспечивается, в большей степени, специфическим (адаптивным) иммунитетом. Его развитие требует более длительного времени и клонирования антиген-специфических В- и Т-клеток. Такие клетки памяти способны быстро отвечать на повторный контакт с антигеном. Для многих внутриклеточных патогенов именно клеточный ответ рассматривается как наиболее достойный внимания исследователей, поскольку внутриклеточная бактерия, ограниченная клеткой хозяина, не доступна для действия антител, поэтому титр антител не коррелирует с уровнем протективной защиты. Механизмы Т-клеточной защиты, такие, как синтез цитокинов и прямая цитотоксичность, вероятно, наиболее эффективны при внутриклеточных инфекциях [167]. Однако некоторые работы показывают, что и В-клетки участвуют в защите при внеклеточной фазе вторичной туляремийной инфекции низко вирулентными штаммами *in vivo* [207, 489].

У людей, переболевших туляремией, вызванной *F. tularensis* subsp. *holarctica*, развивается продолжительный иммунитет, вырабатываются антитела к LPS, белкам теплового шока, белкам мембран и ферментам [121, 219, 249]. Анти-LPS ответ используется в диагностических целях [219]. Антитела к 10 кДа белку-шаперонину могут также быть использованы для диагностики [249]. Специфические антитела персистируют в организме в течение 8 лет у большинства пациентов, но отсутствуют спустя 25 лет после перенесенного заболевания [121, 198].

К настоящему времени показано, что только О-антиген LPS *F. tularensis* индуцирует определенную степень защиты от вирулентных штаммов. Иммунизация LPS обеспечивает защиту от системного заражения аттенуированными и вирулентными штаммами типа B, но не от заражения штаммом типа A и при аэрозольном заражении штаммами типов A и B [161, 219, 220, 460]. Все подвиды *F. tularensis* имеют общий олигосахарид кора и липид A [282]. О-полисахаридная часть LPS является общей для подвидов *tularensis* и *holarctica*, но отличается от О-антигена *F. tularensis* subsp. *novicida* и является необходимой для вирулентности [460]. Показано, что О-антиген *F. tularensis* subsp. *tularensis* важен для внутриклеточного выживания микроорганизма [236]. Очищенные белки, такие, как FopA и 17 кДа липопротеин (TUL4), не способны индуцировать протективный иммунитет, несмотря на их высокую иммуногенность [220, 234].

Наиболее подробно у людей изучен клеточный иммунитет постинфекционного и поствакцинального процессов, вызванных туляремией типа B.

Показано, что для этого процесса характерна пролиферация $CD4^+$ и $CD8^+$ T клеток, которые продуцируют IL-2 и гамма-интерферон при рестимуляции специфическим антигеном [197, 198, 281, 426]. Данный иммунный ответ сохраняется длительное время (до 25 лет) [198]. До сих пор считается, что только вакцинация штаммом LVS или любым другим живым аттенуированным штаммом является эффективной при инфицировании макроорганизма *F. tularensis* типа A [147, 159, 187, 241, 426, 464, 485]. Однако, удаление $CD4^+$ и $CD8^+$ T клеток или снижение уровня гамма-интерферона перед заражением штаммом типа A приводит к отсутствию защиты у мышей [159, 219]. Это служит явным доказательством того, что способность вызывать клеточно-опосредованный иммунный ответ является основой эффективности вакцинного штамма LVS или другого живого аттенуированного штамма, по крайней мере, на мышах.

1.4.4 Современные подходы к созданию улучшенной живой туляремийной вакцины

Несмотря на более чем полувековую историю разработки и изучения существующих вакцинных штаммов *F. tularensis*, генетический анализ показывает, что штамм LVS содержит множественные дефекты по сравнению с природными изолятами subsp *holarctica*, включая как точечные мутации, так и большие делеции [404]. Относительный вклад каждого дефекта в аттенуирование штамма и возможность реверсии остается неизвестным, то есть штамм генетически не детерминирован. Во-вторых, безопасность штамма LVS для людей с ослабленным иммунитетом до сих пор не оценена [158]. В-третьих, штамм имеет ограниченную протективность при высокой дозе (более 100 КОЕ) респираторного заражения штаммом *F. tularensis* subsp. *tularensis* (типа А) и обладает высокой остаточной вирулентностью для человека и животных при респираторном способе вакцинации [258, 341]. В-четвертых, этот вакцинный штамм способен диссоциировать на голубые и серые колонии, которые обладают различной протективной способностью [187]. При серийном призводстве вакцины при культивировании в жидкой питательной среде голубой вариант способен превращаться в серый вариант, который может составлять до 20 % от общего количества клеток [408]. Поэтому работы, направленные на поиск генетических детерминант, изменение которых приводит к снижению реактогенных свойств и повышению стабильности при сохранении иммуногенного потенциала *F. tularensis*, являются актуальными.

Генетические манипуляции с *Francisella* spp. еще недавно были малодоступны в связи с небольшим количеством селективных маркеров и стабильно реплицирующихся плазмид, общей нехваткой генетических средств для комплементации, экспрессии белков или аллельных замен и транспозонного мутагенеза [331]. В настоящее время многие проблемы преодолены, и все больше генетических инструментов становятся доступнее [44, 64, 68, 69, 232, 324, 332, 379, 394].

Современные молекулярные методы, такие, как секвенирование генома, ДНК-микроэррей, транскрипционный и протеомный анализы позволяют изучать основы патогенности туляремийного микроба и выявить основу аттенуации вакцинных штаммов [113]. Эти приемы, с одной стороны, позволяют изучать молекулярно-генетические основы патогенности туляремийного микроба, с другой стороны – дают возможность целенаправленно снижать вирулентность и разрабатывать стратегию создания новых вакцинных штаммов, которые смогут обеспечить эффективный защитный иммунитет против туляремии [275]**.** Разработанные молекулярно-генетические подходы позволяют определять генетические детерминанты *F. tularensis*, имеющие важное значение для размножения в цитозоле эукариотических клеток.

Отличительной особенностью патогенных для человека подвидов туляремийного микроба является наличие у них двух копий участка хромосомы размером 33 т.п.н., фланкированных IS-элементами. Данный участок получил название туляремийный остров патогенности (ТОП или FPI – Francisella pathogenic island) [68, 305]. Как отмечено ранее, вирулентность *F. tularensis* тесно связана с его способностью к размножению в макрофагах. Многие из генов FPI, как предполагается, кодируют важнейшие белки, позволяющие туляремийному микробу избежать фагосомального лизиса, и обеспечивают внутриклеточную репликацию, являющуюся основой вирулентности [128]. В состав FPI входят 4 открытые рамки трансляции (ОРТ) размером 2,5-3,9 т.п.н. и 13 ОРТ размером 1,5 т.п.н. и меньше. Четыре ОРТ организованы, как оперон *iglABCD*. Аминокислотная последовательность белков, кодируемых генами *iglA* и *iglB*, имеет 30 % сходство с белками, выделенными от других бактерий внутриклеточных паразитов [359]. Ген *iglC* кодирует белок размером 23 кДа, который необходим для персистенции возбудителя в макрофагах [235, 233]. В геноме туляремийного микроба этот ген представлен двумя копиями; при их инактивации у возбудителя туляремии снижается вирулентность и способность к выживанию в макрофагах [233]. Гены *fopA* и *iglABCD* специфичны для *F.*

tularensis и имеют высокую степень сходства у всех подвидов туляремийного микроба [58].

Показано, что делеция обеих копий гена *iglC* превращала штамм типа A Schu S4 в полностью авирулентный, но при этом мутантный штамм не обеспечивал какой-либо защиты от заражения штаммами дикого типа, несмотря на способность персистировать в месте инокуляции и диссеминировать во вторичные лимфоидные ткани [409, 463]. Сравнение мутантов по генам показало, что они, в отличие от исходного вакцинного штамма, не вызывают нарушения активации митохондриальной каспазы-9 и каспазы-3, экспрессии фосфатидилсерина, формирования нуклеосом и текучести мембраны [320].

Создание подобных мутантов дает представление о роли отдельных генов FPI при модуляции цитопатогенных эффектов, возникающих при инфицировании макрофагов [320].

Недавние работы с использованием *F. novicida* показали, что открытая рамка считывания *FTN1586* ортологична гену *ansP* и кодирует транспортер аспарагина, который так же необходим для роста бактерии в цитозоле [226]. Аналогичную роль выполняют и другие транспортные белки в штамме LVS - *FTL1645* , *FTL1586* и *FTL0129* [336]. Кроме того, было обнаружено, что в процессе репликации в цитозоле участвуют и другие идентифицированные гены *dipA*, *FTT0989*, *ripA* и *ggt* (γ-глутамилтранспептидаза) [103, 129, 148, 217, 478]. A. Qin, B. J Mann (2006) [394], выполняя работы по транспозонному мутагенезу штамма Schu S4, обнаружили, что для размножения в клетках HepG2 необходима работа многочисленных генов, включая метаболические (*car*, *pur*, *ggt* и т.д.), что подтверждается и другими группами исследователей. D.S. Weiss с соавторами [479] путем создания библиотеки случайных транспозонных вставок в *F. novicida* индентифицировали гены FPI, необходимые для выхода из фагосомы, гены биосинтеза О-цепей ЛПС и еще 44 ранее неизвестных гена, необходимых для обеспечения вирулентности *F. novicida* для мышей [479].

Генетический сиквенс генов *migR*, *trmE* и *cphA* показал, что эти гены участвуют в модуляции экспрессии генов острова патогенности (FPI), обеспечивающих рост внутри фагоцитирующих клеток [131, 143, 316]. Каждый из этих генов влияет на экспрессию генов, косвенным образом изменяющих внутриклеточную концентрацию стрессорных пептидов ppGpp [203], обеспечивающих взаимодействие FevR и РНК-полимеразы и индуцирующих экспрессию FevR -зависимых генов [143]. Несмотря на то, что в мутантах по генам *migR*, *trmE* и *cphA* наблюдали снижение концентрации ppGpp, мутация по гену *trmE* приводила к потере способности штамма LVSΔ*trmE* размножаться в фагоцитирующих клетках. При этом он сохранял способность к размножению в эпителиальных клетках A549 и HEp-2, в то время как LVSΔ*migR* мутант был способен к размножению только в клетках HEp-2. Штамм с делецией гена *cphA* не рос ни в одном из этих типов клеток [203]. Эти данные доказывают, что у различных типов эукариотических клеток могут быть разные причины сдерживания внутриклеточного размножения *Francisella*.

Работы последних лет доказывают, что существуют значительные различия между вирулентными и вакцинными штаммами *F. tularensis*. Например, мутация по гену *migR* уменьшает вирулентность вакцинного штамма LVS *F. tularensis* для мышей, однако делеция по этому же гену в штамме Schu S4 оказывает очень незначительное влияние на вирулентность для мышей [131]. Вероятно, что разница влияния на вирулентность обусловлена различным уровнем экспрессии генов острова патогенности у штаммов Schu S4 и LVS. Показано, что активность *iglA-lacZ* репортера в вирулентном штамме Schu S4 оказалась в 3 раза выше, чем в вакцинном штамме LVS [203].

Кроме того, данные геномного анализа бактерий рода *Francisella* показывают, что снижение вирулентности штаммов подвидов *tularensis* коррелирует с увеличением доли потери генов или их модификации по сравнению с гипотетическим прародителем бактерий вида *F. tularensis* [68, 402, 444].

На FPI находятся три ОРТ, обозначенные как *pdp*-оперон (от англ. – pathogenicity determinant protein), продукты которого необходимы туляремийному микробу для проявления патогенных свойств [359]. Установлено, что инактивация гена *pdpD*, кодирующего белок размером 141 кДа, приводит к снижению вирулентности *F. tularensis* для мышей, а гена *pdpA* – к полной потере вирулентности, т.е. к аттенуации штамма. Особый интерес представляет белок PdpC, который был индентифицирован как укороченная форма белка FSC043, в аттенуированном спонтанном мутанте *F. tularensis* штамма Schu S4 [423]. Изменение белка FSC043 приводит к нарушению репликации в мышиных макрофагах [463]. В одной из недавних работ было показано, что, действительно, степень укорочения белка PdpC влияет на вирулентность штамма Schu. Анализ *pdpC* мутантов с последующей комплементацией свидетельствуют, что этот ген вносит значительный вклад в патогенные свойства *F. tularensis* [466]

В геноме туляремийного микроба присутствует ген *lpn*, кодирующий синтез мембранного белка Tul4 с молекулярной массой 17 кДа. Ген *lpn,* помимо генома туляремийного микроба, выявлен в штаммах *F. philomiragia* и эндосимбионтов клещей рода *Dermacentor* [417, 425].

Внутригеномная гомологичная рекомбинация является ключевым процессом поддержания состава генома микроорганизмов и способствует гетерогенности популяции в составе данной системы, в которой задействовано множество генов, продукты которых являются звеньями данного процесса [296]. Известен ряд работ, посвященных инактивированию элементов гомологичной рекомбинации у некоторых микроорганизмов. Известно, что инактивация генов *recA* и *recBC* в клетках *S. typhimurium* приводит к снижению вирулентности для мышей и замедленному росту в макрофагах (менее выраженному в случае *recA* мутантов), что может быть связано с повышенной чувствительностью к кислородным радикалам, продуцируемым макрофагами [132]. Дефект в генах *recD* у *S. typhimurium*, продуктом которого является белок RecD, обладающий АТФ-азной [144.] и хеликазной [451] активностями, и *recJ,*

продуктом которого является нуклеаза, также приводит к аттенуации штамма для мышей и снижению пролиферации в макрофагах [136].

Туберкулезный вакцинный штамм Russia (на основе штамма Bacillus Calmette-Guerin (BCG)), имеет дефектный *recA* ген и практически не отличается от исходного штамма BCG по уровню экспрессии протективных антигенов, иммуногенности и протективному действию, тогда как другие штаммы эволюционнировали и проявляют различную протективную активность [284]. Таким образом, пример штаммов *M. bovis* BCG и *S. typhimurium* позволяет считать, что мутации в генах системы рекомбинации создают препятствия к изменению свойств у вакцинных штаммов, приводя к их стабильности, а также являются определяющими факторами снижения их остаточной вирулентности.

В геномах *F. tularensis* subsp. *holarctica* [64] и *F. tularensis* subsp. *novicida* [120] в результате клонирования был обнаружен функционально-активный *recA*-подобный ген. Известно, что ген *recA* находится в опероне, включающем регуляторный ген *recX* [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/89109485?], кодирующий регуляторный белок, отвечающий за активацию белка RecA, а также оператор гена *recA,* находящийся на некотором расстоянии. С оператором гена *recA* связывается продукт гена *lexA*. Регуляторные элементы генов *recA* и *lexA* имеют сходную структуру, оба содержат палиндромы и частично гомологичны по нуклеотидным последовательностям. В операторе гена *lexA* есть два сайта связывания с LexA-белком, а в операторе гена *recA* – один сайт. LexA-белок связывается с оператором гена *recA* значительно прочнее, чем с обоими сайтами в операторе собственного гена *lexA* [91].

Показано, что *recA*-подобный ген *F. tularensis* проявляет функциональную активность в штамме *E. coli* HB101 с дефектом собственного гена, повышая устойчивость к УФ-облучению [65]. Также был обнаружен функционально активный *recA*-подобный ген у *F. tularensis* subsp. *novicida,* способствующий повышению устойчивости клеток *E. coli* MM294R к алкилирующим реагентам [120]. Белок RecA участвует в клеточном ответе на повреждение ДНК через SOS-систему [255, 321]. Механизм SOS-индукции в

клетках *E. coli* основан на взаимодействии продуктов генов *recA* и *lexA*. Белок LexA является репрессором и подавляет активность более 17 различных генов. Среди прочих LexA-белок подавляет собственный синтез и синтез белка RecA [88].

Ген *recA* и белок RecA обладает большей консервативностью нуклеотидной и аминокислотной последовательностей на уровне подвидов, что подтверждает его ключевую роль в системе гомологичной рекомбинации у *F. tularensis*. Об этом свидетельствуют различия в гене *recA* и его продукте между видами *F. tularensis* и *F. phylomiraghia* и несущественные различия в нуклеотидной последовательности между подвидами туляремийного микроба, приводящей к замене одной аминокислоты пролин на серин в белке RecA. Мутация по гену *recA* не влияет на способность штамма выживать в нормальной кроличьей сыворотке, размножаться в макрофагоподобных клетках J774, но существенно снижает способность к гомологичной рекомбинации [29].

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности геномов разных подвидов *Francisella* выявил *recD*-подобные гены. Сравнение геномов четырех подвидов *F. tularensis* выявило различия в гене *recD*. Белок RecD является одной из субъединиц мультиферментного комплекса RecBCD (экзонуклеаза V) [305], обладающей АТФ-азной [144] и хеликазной [451] активностями.

Проведенный компьютерный анализ *recD* генов и соответствующих им аминокислотных последовательностей белков у четырех подвидов туляремийного микроба с использованием пакета программ Vector NTI 10,0 выявил наличие в их аминокислотных последовательностях замен аминокислот и протяженные области делеций.

Выявленные схожие генетические повреждения генов *FTT0918* и *FTT0919* в штамме LVS и в эмпирически аттенуированном штамме Schu S4 привели к образованию новой открытой рамки считывания, состоящей из N-конца исходного гена и С-конца образованного гена [404, 463]. Делеция гена *FTT0918*

значительно аттенуирует штамм Schu S4, причем полученный в результате мутант способен индуцировать протективный иммунитет против системного и аэрозольного заражения вирулентным штаммом типа А. Этот мутант значительно более вирулентен, чем LVS, однако функция 58 кДа белка наружной мембраны, кодируемого геном *FTT0918,* неизвестна. Спонтанные мутанты штаммов типа А и типа В, дефектные по данному гену, также значительно аттенуированы для мышей [444, 463].

Определенный интерес вызывает ген *clpB*, кодирующий протеазу теплового шока [240]. Показано, что штамм *F. tularensis* LVS с делетированным геном *clpB* обладает повышенной, по сравнением с исходным штаммом, протективной активностью, защищая мышей от аэрозольного заражения. Хотя двойной мутант *F. tularensis* Schu S4 по генам *FTT0918* и *clpB* формировал протективный иммунитет у мышей, но его уровень был ниже, чем защита, формируемая штаммом *F. tularensis* LVS с делетированным геном *clpB* [160].

Тип IV пили является фактором вирулентности для многих патогенных бактерий. Гены, кодирующие тип IV пили, были идентифицированы в геномной последовательности штамма Schu S4 subsp. *tularensis*, но их вклад в вирулентность данного подвида еще предстоит изучить. Однако, для вирулентности subsp. *holarctica* тип IV пили критичны: они оказываются вовлеченными в диссеминацию патогена из первичного очага инфекции. Спонтанные мутанты клинических вариантов подвида *holarctica*, потерявшие *pilA* ген, становятся значительно ослабленными штаммами для мышей при подкожном заражении. Комплементация приводит к полному восстановлению вирулентных свойств штамма [210]. В противоположность этому, инактивация *pilA* гена в штамме *F. tularensis* subsp. *novicida* усиливает его вирулентность для мышей при подкожном заражении [245]. Одновременное восстановление *FTT0918* и *pilA* генов в штамме LVS посредством комплементации приводит к полностью вирулентному фенотипу, показывая, что эти две мутации имеют большое значение в аттенуировании штамма LVS [209]. Эти данные могут лечь в основу целенаправленного аттенуирования штаммов.

Делеция О-антигенного локуса *wbtDEF* приводила к значительному ухудшению размножения мутантного штамма Schu S4 в макрофагах и организме мышей и потере способности защищать животных при подкожной вакцинации от последующего интраперитонеального заражения умеренными дозами штамма Schu S4 дикого типа [460].

Мутант Schu S4Δ*dsbB* был в значительной степени аттенуирован для мышей при интраназальной инфекции, но такая вакцинация не защищала мышей от интраназального заражения даже малыми дозами штамма Schu S4 дикого типа (13 КОЕ) [393].

Показано, что делеция в опероне *purMCD*, необходимом для пуринового биосинтеза, в штамме *F. tularensis* LVS приводит к значительному снижению вирулентности штамма для мышиных макрофагов и мышей при интраперитонеальном (и/п) способе заражения [381]. Более того, и/п вакцинация этим штаммом вызывает протективный иммунный ответ при заражении тем же способом штаммом LVS дикого типа. Был сконструирован мутантный штамм Schu S4Δ*purMCD,* у которого способность к размножению в макрофагах человека и человеческих эпителиальных пневмоцитах линии A549 была очень снижена. Штамм Schu S4Δ*purMCD* имел высокую степень аттенуации для мышей при интраназальном и внутрикожном путях заражения. Интраназальная вакцинация мышей аттенуированным мутантом Schu S4Δ*purMCD* приводила к повреждению легких и индуцировала протективный иммунный ответ, одинаковый с иммунным ответом, вызываемым вакцинным штаммом LVS и аналогичным мутантным штаммом LVSΔ*purMCD.* Это наводит на мысль, что неспособность LVS обеспечивать полноценную защиту происходит не вследствие антигенной разницы между подвидами. Повторная иммунизация с использованием штамма LVSΔ*purMCD* обеспечивает защиту на уровнях, сравнимых с теми, что наблюдаются при использовании штамма LVS . Этот факт позволяет предположить, что делеция локуса *purMCD* не влияет на экспрессию важнейших антигенных детерминант. Хотя делеция этих генов

приводит к неспособности *F. tularensis* Schu S4 реплицироваться в человеческих макрофагах и эпителиальных клетках *in vitro*, они сохраняют способность освобождаться из фагосомы клетки хозяина до слияния с лизосомой [382].

Из-за различий структур геномов и патологии заболеваний, вызываемых штаммами типов А и В туляремийного микроба, высказывалось предположение, что респираторная вакцинация аттенуированным штаммом типа А *F. tularensis* может обеспечить наилучшую защиту против гомологичного аэрогенного заражения [157, 242, 463, 485]. Однако, имеющиеся к настоящему времени результаты позволяют прийти к выводу, что создание новой генерации живой аттенуированной вакцины для туляремии должно базироваться на менее патогенном биоваре типа В, чем на более реактогенном биоваре типа А. Идентифицированные в штамме LVS мутации могут служить прототипом генов-мишеней с целью создания генетически детерминированных живых вакцинных штаммов на основе охарактеризованных клинических изолятов [126, 305, 404, 463].

Таким образом, основными критериями для рационального отбора перспективных туляремийных штаммов – основы для создания живой туляремийной вакцины – являются точно определенные генетические характеристики, стабильность наследования полезных свойств, способность индуцировать оптимальный протективный иммунитет против заражения вирулентныи штаммами *F. tularensis* типа А и типа В.

1.5 Основные подходы к изучению потенциальных туляремийных вакцинных штаммов

1.5.1 Существующие требования к оценке туляремийной живой вакцины

Как показано выше, несмотря на многочисленные попытки, работы по созданию химической субъединичной вакцины против туляремии пока не увенчались успехом [161, 180, 220, 243, 262]. В настоящий момент эффективную защиту против туляремии обеспечивают только живые вакцины на основе аттенуированных штаммов. Два вакцинных штамма *F. tularensis* LVS и 15 НИИЭГ, которые используются в течение полувека для защиты людей от туляремии, несмотря на высокую протективную защиту, требуют улучшения своих свойств и определения генетической детерминированности их аттенуации [461]. Несмотря на то, что работы по созданию и улучшению свойств туляремийных вакцин проводятся во многих странах, тем не менее, четкой системы критериев оценки разрабатываемых штаммов не существует.

В нашей стране разработаны методические указания "Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба" [49], которые являются основным документом для Государственных комиссий, проводящих доклинические государственные приемочные испытания новых вакцинных штаммов туляремийного микроба. Они же являются нормативным документом и для специалистов научно-исследовательских учреждений, осуществляющих разработку и контроль вакцинных штаммов. Этот документ достаточно объемный (более 40 страниц), имеет 14 глав и 7 приложений. Большая часть из них имеет обязательное исполнение, что необходимо в случае проверки новых штаммов, готовящихся к клиническим испытаниям, но требует большой затраты времени, средств и числа экспериментальных животных (морских свинок) в случае проведения поисковых исследовательских работ. Методические указания направлены, прежде всего, на контроль того, чтобы степень вирулентности и реактогенности у представленных штаммов была не

выше, чем у используемого в нашей стране штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а иммуногенные и протективные свойства были не хуже.

Тщательно проработанные нами существующие методические указания позволили схематично представить их в виде графической таблицы, которая позволяет оценить объем работы при характеристике штаммов согласно указаниям. В соответствии с МУ 3.3.1.2161-07 свойства полученных штаммов сравниваются со свойствами штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Для сравнительной характеристики кандидатов в вакцинные штаммы используются мыши и морские свинки. На мышах в соответствии с МУ 3.3.1.2161-07 определяют только степень остаточной вирулентности испытуемого вакцинного штамма. Все другие показатели – безвредность, реактогенность, иммуногенность, влияние на иммунную систему – исследуют на морских свинках.

В тех немногочисленных патентах, в которых регистрируются новые вакцинные туляремийные штаммы с улучшенными свойствами [24, 39], приводятся описания свойств созданных штаммов, руководствуясь некими критериями, которые кажутся целесообразными исследователям. Так, в патенте на изобретение 1839960 [39] авторы показывают преимущества нового созданного штамма В 399 А-CoLe Str^r 2500/к на примерах изучения его морфологических, тинкториальных, культуральных, физико-биохимических признаков и его агглютинабельности. Остаточная вирулентность, иммуногенность, протективность и стабильность основных биологических свойств проверялась авторами на белых мышах. Дополнительно иммуногенность изучали на десяти кроликах для контрольного и испытуемого штаммов, на которых оценивали и титры специфических антител. Безвредность оценивалась на шести морских свинках. Таким образом, в патенте исследователи приводят доказательства того, что вакцинный штамм В 399 А-CoLe Str^r 2500/к, предлагаемый в качестве живой вакцины против заражения

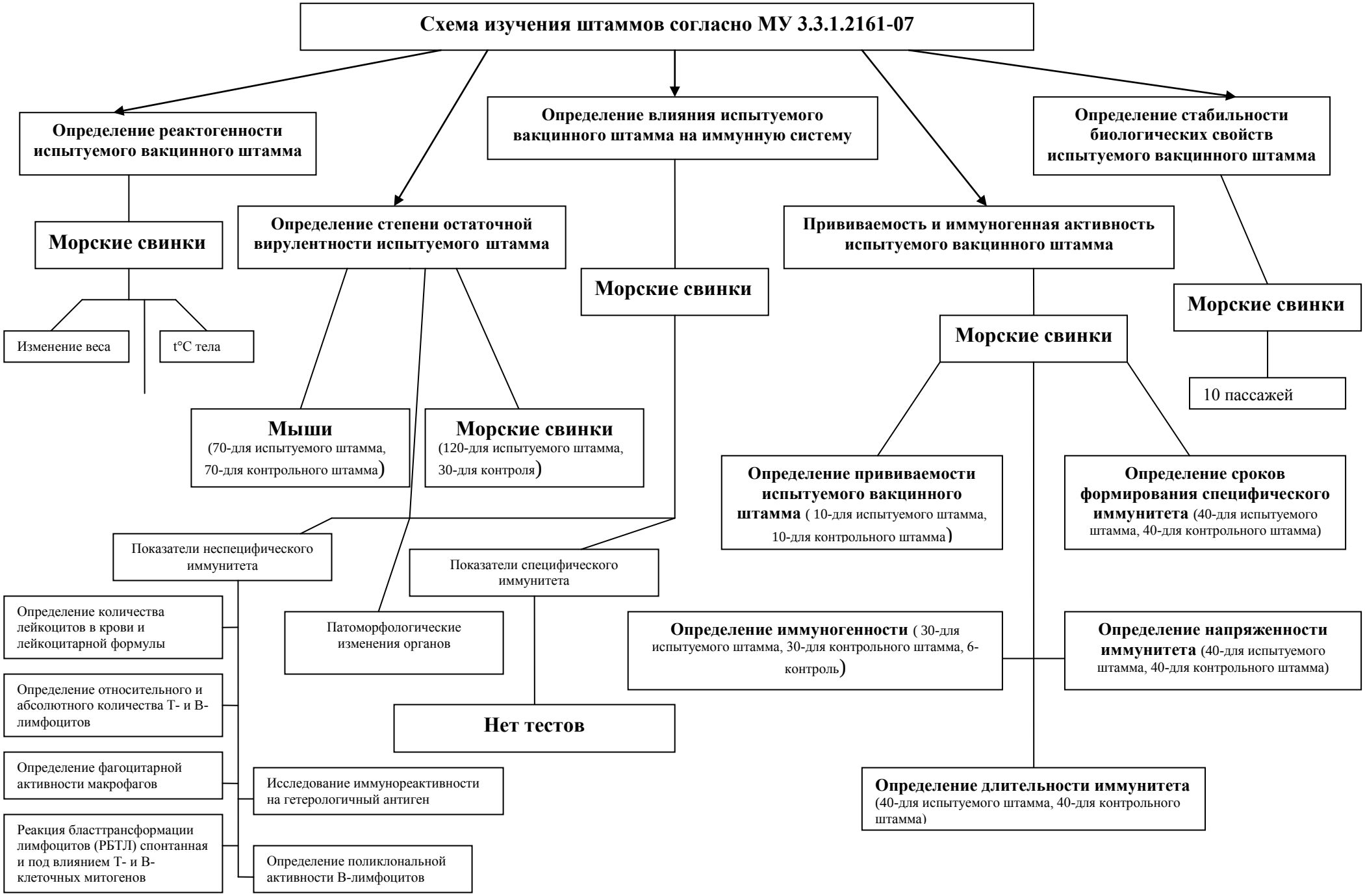


Схема изучения штаммов согласно МУ 3.3.1.2161-07
Определение реактогенности испытуемого вакцинного штамма
Определение влияния испытуемого вакцинного штамма на иммунную систему
Определение стабильности биологических свойств испытуемого вакцинного штамма
Морские свинки
Определение степени остаточной вирулентности испытуемого штамма
Прививаемость и иммуногенная активность испытуемого вакцинного штамма
Морские свинки
Морские свинки
Морские свинки
Изменение веса
t°C тела
10 пассажей
Мыши (70-для испытуемого штамма, 70-для контрольного штамма)
Морские свинки (120-для испытуемого штамма, 30-для контроля)
Определение прививаемости испытуемого вакцинного штамма (10-для испытуемого штамма, 10-для контрольного штамма)
Определение сроков формирования специфического иммунитета (40-для испытуемого штамма, 40-для контрольного штамма)
Показатели неспецифического иммунитета
Показатели специфического иммунитета
Определение количества лейкоцитов в крови и лейкоцитарной формулы
Патоморфологические изменения органов
Определение иммуногенности (30-для испытуемого штамма, 30-для контрольного штамма, 6-контроль)
Определение напряженности иммунитета (40-для испытуемого штамма, 40-для контрольного штамма)
Определение относительного и абсолютного количества Т- и В-лимфоцитов
Нет тестов
Определение фагоцитарной активности макрофагов
Исследование иммунореактивности на гетерологичный антиген
Определение длительности иммунитета (40-для испытуемого штамма, 40-для контрольного штамма)
Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) спонтанная и под влиянием Т- и В-клеточных митогенов
Определение поликлональной активности В-лимфоцитов

туляремийными вирулентными штаммами неарктического подвида, аттенуирован, обладает антигенной активностью, остаточной вирулентностью для белых мышей, иммуногенностью для белых мышей и домашних кроликов, безопасен (безвреден), стабилен по основным биологическим признакам, генетически маркирован и охарактеризован.

В тех немногочисленных патентах, в которых регистрируются новые вакцинные туляремийные штаммы с улучшенными свойствами [24, 39], приводятся описания свойств созданных штаммов, руководствуясь некими критериями, которые кажутся целесообразными исследователям. Так, в патенте на изобретение 1839960 [39] авторы показывают преимущества нового созданного штамма В 399 А-CoLe Str^r 2500/к на примерах изучения его морфологических, тинкториальных, культуральных, физико-биохимических признаков и его агглютинабельности. Остаточная вирулентность, иммуногенность, протективность и стабильность основных биологических свойств проверялась авторами на белых мышах. Дополнительно иммуногенность изучали на десяти кроликах для контрольного и испытуемого штаммов, на которых оценивали и титры специфических антител. Безвредность оценивалась на шести морских свинках. Таким образом, в патенте исследователи приводят доказательства того, что вакцинный штамм В 399 А-CoLe Str^r 2500/к, предлагаемый в качестве живой вакцины против заражения туляремийными вирулентными штаммами неарктического подвида, аттенуирован, обладает антигенной активностью, остаточной вирулентностью для белых мышей, иммуногенностью для белых мышей и домашних кроликов, безопасен (безвреден), стабилен по основным биологическим признакам, генетически маркирован и охарактеризован.

Другой патент на изобретение №2308969 [24] касается живой туляремийной вакцины − Nik-sp *Francisella tularensis*. Остаточная вирулентность проверялась на мышах линии Balb/c или золотистых хомячках (по 4 животных на дозу) или морских свинках (по 2 особи на каждую дозу). Изучение персистенции

селекционного мутанта Nik-sp *F. tularensis* и формирование у животных Т-клеточного иммунитета изучались на мышах линии Balb/c по результатам высевов из паренхиматозных органов по визуальным и гистологическим исследованиям этих органов. Протективные свойства заявленного для патентования штамма оценивались на 15 морских свинках. В формуле изобретения указано, что полученный путем селекции микробиологическим способом из чистой линии бактерий R-формы штамма 15 НИИЭГ *F.tularensis* штамм Nik-sp представлят собой S-форму. Максимальная иммунизирующая доза для лабораторных животных при подкожном введении составляет от 1×10^4 до 1×10^8 микробных клеток, способна защищать от инфицирования *F. tularensis* subsp. *tularensis* 503 и имеет значительное преимущество перед уже существующей живой вакциной 15 НИИЭГ *F. tularensis*, которое дополняется его высокой стабильностью.

Оба рассмотренные патента имеют свой алгоритм описания свойств новых созданных штаммов, который в обоих случаях не соответствует требованиям МУ 3.3.1.2161-07. Возможно, выполнение этих методических указаний затруднено необходимостью использования большого количества морских свинок или слишком объемными исследованиями. Однако МУ 3.3.1.2161-07 направлены на единообразность исследований, что позволяет сравнивать штаммы по определенным параметрам. Очевидно, что создание упрощенного алгоритма оценки ряда критериев при изучении свойств новых вакцинных штаммов против туляремии повысит эффективность доклинических испытаний, а разработанные критерии позволят проводить необходимое и достаточное количество исследований для сравнения новых штаммов друг с другом.

1.5.2. Новые методические приемы при изучении потенциальных туляремийных вакцинных штаммов

Анализ данных литературы показывает, что в настоящее время работы по созданию эффективных вакцинных препаратов против туляремии стали более интенсивными. Это обусловлено, с одной стороны, возможностью использования этого патогенна в качестве агента биотерроризма, а с другой – расширением

спектра параметров оценки иммунного ответа, позволяющих более полно изучать патогенез туляремийной инфекции и на основе полученных данных создавать новые вакцинные препараты с улучшенными свойствами.

В настоящее время при исследовании протективных свойств создаваемых вакцин наметилась тенденция более детального изучения их влияния на иммунологические реакции макроорганизма. Доказано, что протективные свойства вакцинных препаратов обусловлены, прежде всего, Т-клеточным иммунитетом [164, 165, 166, 167, 192, 193, 293, 298, 407], благодаря которому на протяжении 25-30 лет сохраняется защита у переболевших [195, 197, 198]. Ранее оценка этого звена иммунитета проводилась по кожной пробе с тулярином, которая, по сути, являлась реакцией гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [48, 58, 224]. Безусловно, как и всякая аллергическая проба, она не безопасна и не всегда её просто учитывать, особенно у животных. В настоящее время в некоторых работах это звено иммунной защиты оценивается *in vitro* по продукции гамма-интерферона спленоцитами или лимфоцитами вакцинированных или зараженных туляремией животных [196, 396]. Большое внимание уделяется определению Т-лимфоцитов, несущих CD4, CD8, CD80, CD86 рецепторы, и NK клеток. Использование проточной цитофлуориметрии позволяет оценить продукцию внутриклеточных и внеклеточных цитокинов [415, 115]. Исследователями уделяется большое внимание изучению цитокиновых профилей в органах-мишенях и в сыворотке крови [420, 164, 334]. Показано, что наиболее значимыми при туляремии являются такие цитокины, как гамма-интерферон, ФНО [134], IL-12 [181], IL-17 [315, 335, 376], IL-1β, IL-6, а также MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2) и MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1), являющихся маркерами гибели клеток [403].

При изучении гуморального звена иммунитета в настоящее время большое внимание уделяется определению классов и подклассов специфических антител [292, 294, 438]. Показано, что, как и для других инфекций, первичными антителами при вакцинации или заражении туляремией являются антитела IgM [403], более поздними специфическими антителами являются антитела подкласса

IgG2. Показано, что присутствие специфических антител класса IgA обеспечивает протективный эффект вакцинации при аэрозольном инфицировании [302, 333], поэтому исследователи работают над разработкой новых схем иммунизации, которые позволили бы повысить выработку специфических антител этого класса.

Несмотря на совершенствование иммунологических исследований при изучении вакцинных препаратов, их эффективность оценивается, как и раньше, прежде всего по протективным свойствам [160, 270]. По-прежнему оценивается степень обсемененности органов и патоморфологические изменения органов-мишеней [403]. В качестве критерия тяжести клинических проявлений при экспериментальной туляремии у мышей используют динамику веса животных [403]. Некоторые исследователи оценивают остроту воспалительных реакций по биохимическим параметрам крови (С-реактивному белку и аминотрансферазам) [294].

Одним из современных направлений при изучении иммунопатогенеза вакцинного процесса, в частности, при туляремии, является использование антител против значимых цитокинов и иммунокомпетентных клеток [181], а также введение вакцинных препаратов совместно с цитокинами [115, 415]. Это направление позволяет исследовать тонкие механизмы иммунной защиты при туляремийной инфекции и помогает в разработке новых вакцинных препаратов.

Следует подчеркнуть, что существующие тест-системы, моноклональные антитела против популяций лимфоцитов и цитокинов разработаны для клинических исследований человека и для наиболее популярной экспериментальной биологической модели – мыши.

1.5.3. Использование лабораторных животных для экспериментальной туляремии при разработке вакцин против этого заболевания

Туляремия является зоонозной инфекцией; её природные очаги поддерживаются ежегодными эпизоотиями. Восприимчивость мелких грызунов к данному заболеванию позволяет исследователям использовать их для изучения иммунопатологических изменений на экспериментальной модели туляремийной инфекции. Использование животных в научных экспериментах является

неотъемлемой частью процесса научного познания. К настоящему времени выведены сотни линий животных разных видов. При широкой возможности выбора животных для исследования все труднее сделать правильный обоснованный выбор.

Восприимчивость к туляремии различных видов животных неодинакова. Проведем сравнение преимуществ и недостатков использования тех или иных видов животных при оценке иммунопатогенеза туляремии.

По ряду причин для большинства иммунологических исследований используется мышиная модель туляремии. Туляремийный микроб в организме мышей поражает те же органы-мишени, вызывая развитие в инфицированных тканях характерных гранулематозных поражений, сходных с поражениями, развивающимися в тканях инфицированных людей. Однако существует большое различие в вирулентности штаммов для людей и мышей [387]. При заражении *F. tularensis* (тип А и В), а также *F. novicida*, мыши погибают в течение недели от любой дозы, введенной любым способом. Напротив, инфекции, вызываемые туляремийным микробом В типа редко бывают смертельными для человека [301, 437]. Заражение человека *F. novicida* довольно редко имеет место, и, как правило, обнаруживается у людей с ослабленным иммунитетом [254, 311, 481].

У мышей штамм LVS вызывает сублетальную инфекцию при внутрикожном заражении, но при заражении низкими дозами другими способами (внутривенно, внутримышечно или внутрибрюшинно) или средними дозами при респираторном заражении мыши погибают [192]. Например, в работе J.W. Conlan с соавт. (2003) [155] мышей линий BALB/c и C57BL/6 заражали аэрозольно и внутрикожно низкими дозами (~ 10-20 м.к./животное) вирулентных штаммов *F. tularensis* типа А и типа В и наблюдали за развитием и течением заболевания. Мыши обеих линий были одинаково восприимчивы к заражению, но при инфицировании штаммом типа А мыши умирали на несколько дней раньше, чем при инфицировании штаммом типа В, независимо от способа заражения. У мышей линии BALB/c явные признаки инфекции развивались в течение нескольких дней, в то время как у мышей линии C57BL/6 заболевание протекало

бессимптомно, и признаки инфекции появлялись только за несколько часов до гибели животных. При гибели животных наиболее выраженные патогистологические изменения наблюдали в печени и селезенке, в легких изменения были менее выражены даже при аэрозольном способе заражения. Таким образом, независимо от пути передачи инфекции, причиной смерти при заражении мышей низкими дозами вирулентных штаммов *F. tularensis* было системное поражение организма.

В недавней работе J. W. Conlan с соавт. (2011) [156] рассматриваются положительные стороны использования различных линий мышей для изучения патогенеза и специфического иммунного ответа при туляремийной инфекции. Они показали, что при комбинации различных линий мышей и различных по вирулентности штаммов возбудителя туляремии, а также различных способов заражения, мышиная модель экспериментальной туляремии может быть использована для изучения полноценной картины туляремийного инфекционного процесса. Если смотреть шире, то исследования с использованием живого вакцинного штамма *F. tularensis* LVS являются удобной и легко интерпретируемой модельной системой для изучения иммунного ответа хозяина-млекопитающего на внутриклеточные патогены. Использование трансгенных линий мышей для изучения отдельных звеньев иммунитета при туляремии очень малочисленны. На сегодняшний день есть только одно сообщение об исследованиях на трансгенных мышах линии HLA-DR4 при заражении их туляремией, которое проводили с целью выявить антигены, распознаваемые Т-клетками человека [488]. Но, как и следовало ожидать, эти мыши были восприимчивы к интраназальному заражению LVS, как и мыши дикого типа.

Исследования, кроме лабораторных мышей, проводились и на полевках [117, 371]. LD_{50} для полевок при заражении подкожно штаммом типа B *F. tularensis*, составила менее 10 микробных клеток [117]. Полевок использовали для доказательства возможности передачи туляремии содержащимся в одной клетке животным [371]. Животные в клетке заражались, если съедали зараженный труп полевки или белой мыши. Примерно у одной трети инфицированных

полевок возбудителя выделяли из мочи, также бактерии были обнаружены в экскрементах одной полевки [117]. Было показано, что титр бактерий *F. tularensis* в моче инфицированных полевок достигал 10^5 КОЕ/мл, специфическая бактериурия сохранялась в течение 80 дней. В почках обнаруживали очаги некроза в клубочковой зоне и в интерстициальной ткани. Специфические гранулемы были также обнаружены в лимфатических узлах, селезенке и печени. Это доказывает, что полевки могут быть резервуаром хронической туляремийной инфекции, поддерживая эпизоотические очаги, и представляют опасность заражения других животных и человека.

Приведенные литературные данные свидетельствуют о том, что мыши могут быть использованы в качестве биологической модели для изучения иммунного ответа человека при заражении туляремией и для исследования вакцин. Однако мышиную модель нельзя использовать для определения степени вирулентности штаммов *F. tularensis*, поэтому продолжаются работы с использованием других видов животных при изучении иммунопатогенеза туляремийной инфекции.

Несмотря на то, что мыши являются очень популярной моделью, при изучении туляремии традиционно использовались и другие животные, в частности, крысы, морские свинки, хомяки, полевки и кролики. В недавней публикации H.J. Ray с соавт. (2010) [397], а также в публикации S.C. Cowley с соавт. (1997) [168], при сравнении заражения различными штаммами *F. tularensis* крыс линии Фишер 344 с другими животными моделями, исследователи показали, что при оценке степени вирулентности различных туляремийных штаммов этот вид животных наиболее приближен к человеку. Показано, что LD_{50} при интратрахеальном заражении крыс линии Фишер 44 для штамма SchuS4 *F. tularensis* подвид *tularensis* типа A составляла 5×10^2 КОЕ, для штамма OR960246 *F. tularensis* подвид *holarctica* типа B – 1×10^5 КОЕ; а для подвида *F. novicida* – 5×10^6 КОЕ, и $> 10^7$ КОЕ – для вакцинного штамма LVS [397]. Однако, следует отметить, что крысы линии Фишер 344 были очень чувствительны к интратрахеальному заражению другим штаммом FSC108

F. tularensis подвида *holarctica* тип B, но устойчивы к интратрахеальному заражению LVS [398]. Исследователи, проводившие свои работы с использованием крысиной модели при изучении экспериментальной туляремийной инфекции, считают, что её течение более схоже с течением этой инфекции у человека, в отличие от мышиной модели. Важно отметить, что крысы линии Фишер 344, вакцинированные интратрахеально, внутрикожно или подкожно LVS в дозе ~ 10^7, выжили после интратрахеального заражения 100 DCL штаммом SchuS4 *F. tularensis* [397, 485]. Интересно отметить, что причина гораздо большей устойчивости крыс линий Фишер 344 и Льюис к инфицированию подвидом *F. novicida* по сравнению с мышами является, по-видимому, следствием более быстрой продукции оксида азота макрофагами крыс [168, 397]. Таким образом, крысиная модель экспериментальной туляремии, в частности, с использованием крыс линий Фишер 344 и Льюис, может быть полезна при изучении вирулентности новых природных изолятов.

Морские свинки и кролики традиционно использовались при изучении *F. tularensis.* В основном эти исследования относятся к времени пионерских работ с туляремийной инфекцией. Именно эти животные использовались при создании и изучении протективных свойств вакцинного штамма 15 НИИЭГ и LVS. Исследования на морских свинках проводили для изучения способности штамма LVS защищать животных от вирулентных штаммов *F. tularensis* [187]. Было показано, что штамм LVS, в отличие от убитой вакцины, способен создавать протективный иммунитет против подкожного заражения штаммом SchuS4. В этой же работе при сравнении вариантов живых вакцин (голубых и серых колоний) было показано, что вакцинация голубым вариантом живой вакцины лучше защищала морских свинок от заражения штаммом SchuS4 по сравнению с вакцинацией серым вариантом, поскольку смертность в этой группе после заражения оказалась на уровне контрольной группы. Морские свинки, вакцинированные аэрозольно, выживали лучше как при подкожном, так и аэрозольном заражении штаммом SchuS4 по сравнению с морскими свинками, которых вакцинировали подкожно [187].

Интерес к кроличьей модели туляремийной инфекции обусловлен существенной ролью лагоморфов (зайцеобразных) в распространении туляремии в природных очагах [118]. Большинство видов диких и лабораторных кроликов восприимчивы к туляремии типа А, а некоторые из них чувствительны и к штаммам типа В. Было отмечено, что зайцы в Европе инфицированы *F. tularensis* подвида *holarctica* [353], кролики Северной Америки чаще всего заражены *F. tularensis* подвида *tularensis* и подвида *holarctica,* и реже –*F. tularensis novicida* [422]. Люди заражаются при контакте с инфицированными кроликами. Основной источник туляремии в Соединенных Штатах – больные кролики, с которыми контактируют люди, особенно в зимние месяцы.

Одна из работ посвящена исследованию аэрозольного заражения кроликов штаммом SchuS4 *F. tularensis* [116]. Заражающая доза у 10 кроликов составила 1-2 $\times$ 10^5 и 3-х кроликов - 2-4 $\times$ 10^8 бактерий. Предварительные исследования показали, что обычно животные погибали через 5 дней, и поэтому описание патологии, вызванной инфекцией, соответствует 4 дню после инфекции. Развитие клинических симптомов практически не зависело от дозы заражения: на третий день после инфицирования поднималась температура до 40,5° С, снижался аппетит и развивалась диарея. Гистологическое исследование показало, что через 24 ч после заражения ограниченные изменения были в легких, которые представляли небольшие очаги скопления нейтрофилов. Через 48 ч повреждения были видны на поверхности легких, наблюдался некроз эпителия бронхов и бронхиол. В легочных артериях лейкоциты прикреплялись к эндотелию и проникали в субэндотелиальную область. Незначительные повреждения были отмечены в эпителии носовой полости и в трахее. Были поражены шейные и бронхиальные лимфатические узлы. В селезенке и печени наблюдали скопления нейтрофилов. Через 72 ч после заражения объем повреждений быстро увеличивался, были задеты легкие, большие участки бронхиальной стенки были подвергнуты некрозу, эпителий полностью отторгался. Альвеолярные повреждения сливались как при типичной некротической пневмонии. Крупные и мелкие артерии были поражены во всех исследованных тканях. В лимфатических

узлах развивался некроз. Через 96 ч гистологическая картина качественно напоминала изменения через 72 ч, но масштаб поражений увеличивался.

Еще одна работа касается внутрикожного заражения домашних кроликов в подушечку стопы задней лапы штаммом SchuS4 *F. tularensis* [102]. При заражающей дозе 1000 КОЕ бактерии обнаруживали в подколенных лимфатических узлах через 8 ч после заражения. Инфекция быстро становилась системной, бактерий обнаруживали в крови, костном мозге и легких через 36 ч после заражения. На 3 день у кроликов развивался сепсис, и они умирали на 4-6 день после заражения. Некротические поражения были отмечены на месте введения в лимфатических узлах, печени, костном мозге и легких. Патологические изменения были похожи на изменения при язвенно-бубонной форме туляремии у людей. В другой работе определяли гематологические показатели крови после заражения штаммом SchuS4 иммунизированных и интактных кроликов [247]. Динамика изменений гематологических показателей и степень этих изменений у не вакцинированных и вакцинированных LVS животных не изменилась, но выживаемость вакцинированных кроликов была выше.

Анализируя степень вирулентности штамма типа А *F. tularensis* для домашних кроликов и обезьян резус-макак, исследователи пришли к выводу, что, учитывая способность штамма ферментировать глицерин, можно прогнозировать степень вирулентности штамма и для человека [259, 416]. При подкожном заражении кроликов можно дифференцировать штаммы пониженной вирулентности. J.R. Bell и соавторы провели анализ степени вирулентности *F. tularensis* штаммов типов А и В при заражении кроликов, мышей и морских свинок [118]. Было отмечено, что для более вирулентного штамма типа А LD_{50} была одинакова для всех трех видов животных (<10 КОЕ), но для менее вирулентных штаммов типа В LD_{50} была различной. Для мышей смертельная доза составила менее 10 КОЕ, морские свинки имели промежуточную восприимчивость, а кролики были очень устойчивыми к инфекции и выживали после заражения дозой, превышающей 10^6 м.к./кролика.

При сравнении способности убитых формальдегидом и убитых нагреванием бактерий *F. tularensis* защищать кроликов против подкожного заражения вирулентным штаммом было показано, что вакцина на основе убитых формальдегидом бактерий была лучше, чем вакцинный препарат из инактивированных нагреванием микроорганизмов [118]. Длительность защиты была лучше у кроликов с более отдаленным интервалом между последней вакцинацией и заражением вирулентным штаммом. Описаны существенные различия в поражениях органов после инфицирования у вакцинированных и не вакцинированных кроликов. Для этих исследований штамм *F. tularensis* был выделен от заболевшего человека, причем неизвестно, к какому подвиду он относился.

Оценка эффективности вакцинации штаммом LVS проводилась на новозеландских кроликах [366, 367]. Внутрикожно и подкожно вакцинированные LVS кролики (10^5 КОЕ/кролика) жили после заражения SchuS4 *F. tularensis* на 3 дня дольше, чем не вакцинированные. При внутривенном введении кроликам штамма LVS в дозе до 10^{10} КОЕ кролики быстро погибали. В литературе практически отсутсвует описание патологических изменений и обсемененности органов у кроликов после заражения LVS.

Изучение иммунопатогенеза экспериментальной туляремии на кроличьей модели является еще одним аспектом исследований. Кролики использовались для иммунологических исследований *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что макрофаги новозеландских кроликов очень чувствительны к заражению штаммами *F. tularensis* обоих типов - типа А (SchuS4) и типа В (LVS) [367]. Кроличьи макрофаги не могли контролировать внутриклеточное размножение при заражении штаммом SchuS4 и погибали в течение суток. В случае инфицирования макрофагов штаммом LVS при той же кратности заражения, что и штаммом SchuS4, наблюдали размножение бактерий, но к гибели макрофагов это не приводило.

Известно, что ЛПС живого вакцинного штамма (LVS) является протективным антигеном для мышей, способным защищать при заражении

штаммом LVS, но не при заражении вирулентным штаммом SchuS4. Кроличьи моноклональные и поликлональные антитела используются для определения видоспецифичного сходства и различия ЛПС. Антитела против туляремии в сыворотке крови кроликов обнаруживаются в их природных популяциях [352, 354, 422], что позволяет проводить мониторинг эндемичных очагов этого опасного инфекционного заболевания. Сходство патологии заболевания у кролика и человека делают кролика отличной моделью для изучения степени вирулентности штаммов *F. tularensis*. Результаты исследований на кроликах будут репрезентативными и могут прогнозировать клинические исходы у людей.

Несмотря на привлекательность модели с использованием небольших грызунов при изучении экспериментальной туляремии, использование приматов остаётся важным для фундаментальных исследований и для тестирования вакцинных и лекарственных препаратов. Исторически сложилось, что приматы считаются более восприимчивыми к туляремийной инфекции, чем люди. Неоднократно сообщалось о вспышках туляремии у различных видов обезьян в зоопарках и экспериментальных колониях [360, 435]. Существует масса более ранних публикаций об исследованиях на обезьянах, в частности, на макаках резус, как в естественной среде, так и в экспериментах по вакцинации [326, 301].

Совсем недавно интерес к разработке живых вакцин позволил возобновить проведение исследований с использованием приматов. Для мартышек (*Callithrix jacchus*) аэрозольное введение всего лишь 10 КОЕ/животное *F. tularensis* подвида *tularensis* типа А (SchuS4) является смертельным, а развивающиеся при этом патологические изменения очень схожи с изменениями при туляремии у человека. При инфицировании у мартышек увеличивается синтез провоспалительных цитокинов, а также субпопуляций основных лимфоидных и миелоидных клеток в легких и крови [361, 362]. Похожие результаты получены и при аэрозольном заражении африканских зеленых мартышек (*Chlorocebus aethiops*) штаммом SchuS4 [462] и при заражении явайских макак [482]. Вероятно, дальнейшие исследования покажут ценность различных видов приматов для изучения патогенеза и иммунологических исследований.

Определить наиболее оптимальную модель лабораторных животных для оценки экспериментальной туляремии и вакцинации против этого заболевания сложно. Во-первых, необходимо больше информации о видах животных, включая крыс, кроликов и морских свинок, и об ответе на инфекцию *F. tularensis*, создав базу данных, которая включала бы в себя клиническую, иммунопатологическую и микробиологическую информацию для каждой животной модели. Во-вторых, каждую модель целесообразно использовать для определенных исследований, к примеру, проводить оценку реактогенности на мышиной модели, а вирулентности - на морских свинках и кроликах.

В таблице 9 сравнивается клинико-патологическая картина туляремии у различных видов животных, а также описаны преимущества и недостатки разных моделей. Важно помнить, что идеальной биологической модели не существует ни для туляремии, ни для других инфекций. Совершенствование методов сравнения иммунопатологических ответов разных видов животных с помощью вычислительных стратегий позволят создать корреляционный алгоритм, использующий как положительные, так и отрицательные аспекты реакций различных моделей животных.

Таблица 9 – Преимущества и недостатки разных моделей животных при инфицировании *F. tularensis*

Вид	Преимущества	Недостатки
Человек	Основная мишень для разработки новых лекарств и вакцин. Инфекция хорошо описана.	Негативное общественное восприятие. Высокая степень риска.
Обезьяна	Протективный эффект LVS вакцины как у людей.	Высокая стоимость животных и их содержания. Низкая устойчивость к типу А.
Мышь	Низкая стоимость животных. Наличие иммунологических методов для изучения ответа хозяина. Наличие линий генетически модифицированных мышей.	Очень чувствительны к заражению LVS. Вакцинация LVS плохо защищает против штамма SchuS4. Протективный эффект LVS недолгий.

Продлжение таблицы

Вид	Преимущества	Недостатки
Крыса	Протективный эффект LVS после внутрикожной или аэрозольной вакцинации подобен человеческому. Низкие дозы инфекции.	Высокая устойчивость к LVS и SchuS4.
Кролик	Чувствительность к штамму SchuS4. Более устойчивы к типу B.	Мало данных. Некоторые исследователи сообщают, что вакцинация LVS не вызывает протективноо ответа. По существу, иммунологических методов для определения ответа хозяина нет.
Морская свинка	Чувствительность к штамму SchuS4.	Иммунологических методов для определения ответа хозяина нет. Есть сообщения, что вакцинация штаммом LVS не вызывает протективного ответа.

1.6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Анализ литературных данных показывает, что, несмотря на значительное количество работ, посвященных молекулярно-генетическим методам исследования возбудителя туляремии, весьма актуальным является совершенствование исследований генетического разнообразия штаммов *F. tularensis*. На настоящий момент метод MLVA-типирования, разработанный A. Johansson, включающий набор из 25 VNTR-маркеров, широко используется в мировой научной практике для генотипирования туляремийного микроба [274]. Следует отметить, что количество локусов для типирования играет ключевую роль в разрешающей способности данного метода, значительно увеличивая число идентификационных генотипов. В отечественной литературе описано MLVA-типирование коллекции из 352 штаммов *F. tularensis* по 4 локусам, однако более масштабного типирования отечественных штаммов *F. tularensis* до настоящего времени не проводилось. Наши исследования направлены на изучение генетического разнообразия коллекции штаммов *F. tularensis,* выделенных на территории Российской Федерации, и оптимизацию метода с сохранением его

разрешающей способности для характеристики природных очагов туляремии и проведения эпидимеологического анализа вспышек.

Молекулярно-генетические механизмы подвидовых биохимических различий *F. tularensis*, которые ранее служили основой подвидовой дифференциации, до настоящего времени детально не изучены. На наш взгляд, такие сведения важны как для эволюционно-патогенетических аспектов исследований *F. tularensis*, так и для детекции диагностически значимых биохимических признаков методом ПЦР, что помогло бы значительно уменьшить риски, возникающие при работе с живой культурой и ускорить индентификацию штаммов.

Литературные данные о существовании природных очагов туляремии и регулярно возникающих эпизоотиях, подтверждающихся значительным числом положительных на туляремию проб из объектов внешней среды, а также ежегодно регистрируемые вспышки заболевания туляремией доказывают, что и в начале XXI века туляремия остается актуальной проблемой в инфекционной эпидемиологии [51, 385], что требует совершенствования вакцинопрофилактики. В связи с этим нами пранализированны многочисленные работы по поиску генов-мишеней с целью создания новых генетически детерминированных живых вакцинных штаммов на основе вакцинного штамма LVS и вирулентных штаммов голарктического и неарктического подвидов [126, 305, 404, 463]. Современные молекулярные методы, такие, как секвенирование генома, ДНК-микроэррей, транскрипционный и протеомный анализы позволяют изучать основы патогенности туляремийного микроба и выявить основу аттенуации вакцинных штаммов. Несмотря на достигнутые успехи в этой области, создаваемые варианты потенциальных вакцинных штаммов с детерминированными генетическими мутациями, описанные в литературе, не обладают свойствами, удовлетворяющими всем требованиям к живым вакцинам.

При разработке новых штаммов существует постоянная необходимость проверки получаемых генетически детерминированных мутантов. При

скрининговой проверке штаммов не всегда целесообразно проводить полный объём исследований, изложенных в МУ 3.3.1.2161-07. Это экономически очень затратно, к тому же биоэтические нормы, принятые во всем мире, требуют минимизации количества животных, привлекаемых к исследованиям. Исследователями используются ряд методических подходов, позволяющих эффективно изучать туляремийный микроб. Например, способность размножаться в макрофагах оценивается на клеточных линиях [235], изучение клеточного иммунитета проводится по активности гамма-интерферона в супернатанте спленоцитов вакцинированных животных [397], изучение динамики снижения веса мышей проводится при заражении вирулентным туляремийным штаммом [397]. Однако данных по системному использованию этих показателей при изучении потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы обнаружено не было. Поэтому нами и была поставлена задача разработки алгоритма исследований новых вакцинных штаммов для повышения эффективности изучения при их создании для снижения количества животных, необходимых для проверки штаммов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 2 ГЕНОДИАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

Развитие микробиологии непосредственно связано с совершенствованием методов идентификации патогенных микроорганизмов. Дифференциация и идентификация возбудителей – определение родовой, видовой и типовой принадлежности микроорганизмов – является трудоемким и ответственным этапом микробиологического исследования. Он осуществляется на основании изучения целого комплекса свойств: морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных и антигенных. Этот процесс выполняется в несколько этапов, требует большого количества дифференциально-диагностических сред, реактивов, посуды, что значительно удорожает стоимость анализа и удлиняет сроки его проведения. Результаты удается получить через 4-7 сут.

Генодиагностика – относительно новый раздел диагностики, который позволяет обнаруживать гены или последовательности нуклеиновой кислоты, специфичные для определенного вида возбудителя инфекционного заболевания. [12]. Развитие методов генодиагностики позволило значительно повысить эффективность выявления возбудителя и ускорить время получения результатов. Использование молекулярно-генетических исследований позволяет проводить прямое определение специфического фрагмента генома микроорганизма – возбудителя инфекционного заболевания. До начала наших работ не существовало коммерческих генодиагностических тест-систем для выявления возбудителя туляремии.

2.1 Создание тест-системы «MULTI-FLU» для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов

В рамках мониторинга для предотвращения и распространения завозимых из-за рубежа возбудителей особо опасных инфекций существует задача по их дифференциальной лабораторной диагностике. Несмотря на большое

разнообразие методов, позволяющих дифференцировать видовую принадлежность возбудителей инфекций, сохраняется потребность в высокотехнологичных, информативных и экономически целесообразных методах, позволяющих одновременно выявлять микроорганизмы I-II группы патогенности.

Возбудители чумы, сибирской язвы и туляремии относятся к I-II группе патогенности и вызывают особо опасные заболевания человека и животных. Так как летальность при легочной форме этих заболеваний чрезвычайно высока, данные виды рассматриваются в качестве потенциальных агентов биотерроризма. Эпидемиологическая обстановка по данным инфекциям остается достаточно сложной. Это обусловлено активностью природных очагов и ростом возможностей заноса возбудителей с эндемичных территорий на эпидемически благополучные. Актуальность проведения данной работы обусловлена способностью данных микроорганизмов существовать в природных резервуарах в виде спор, чрезвычайно устойчивых к химическому и физическому воздействию (*Bacillus anthracis),* или долгое время персистировать в популяциях грызунов (*Yersinia pestis* и *Francisella tularensis*).

На территории Российской Федерации и ближнего зарубежья расположено 45 природных очагов чумы, в большинстве которых циркулируют штаммы основного высоковирулентного подвида. Род *Yersinia* входит в семейство *Enterobacteriaceae* и состоит из 17 видов, три из которых патогенны для человека – *Y. pestis, Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Вид *Y. pestis* произошел от вида *Y. pseudotuberculosis* и имеет до 99% нуклеотидной идентичности для большинства общих генов, однако радикально отличается от своего предка по тяжести вызываемого заболевания [493, 487]. Существуют две основные проблемы в идентификации чумного микроба: определение хромосомы *Y. pestis* обычно включает амплификацию геномных последовательностей, общих с *Y. pseudotuberculosis* или *Y. enterocolitica*, что не позволяет однозначно идентифицировать вид возбудителя чумы без анализа специфичных чумных плазмид. И второе – большое количество опубликованных данных оценивает

очень ограниченное число изолятов *Y. pestis,* что недостаточно для адекватной эффективности анализа.

Возбудитель сибирской язвы *B.anthracis* таксономически принадлежит к группе *B. cereus*, в которую входят шесть близкородственных видов, такие как *B. cereus, B. anthracis, B. thuringiensis, B. mycoides, B. pseudomycoides* и *B. weihenstephanensis*. Геномы *B. anthracis, B. cereus* и *B. thuringiensis* имеют очень небольшие различия и генетически не различаются при использовании целого ряда методов [110, 111, 251]. Большинство генетических и функциональных различий между видами связано с наличием плазмид, их количеством и размерами. Вирулентные штаммы *B. anthracis* содержат две высокомолекулярные плазмиды pX01 и pX02. Бесплазмидные штаммы *B. anthracis* утрачивают свою вирулентность, однако их идентификация может являться индикатором присутствия вирулентных штаммов в окружающей среде. Плазмиды pX01 и pX02 передаются в другие виды бацилл. Кроме того, некоторые плазмидные гены обнаружены в хромосомах и собственных плазмидах *B. cereus* и *B. thuringiensis*. [151, 375, 395, 406]. Трудности при индикации возбудителя сибирской язвы в биологическом материале и объектах окружающей среды связаны с необходимостью обнаруживать бесплазмидные, моно- и биплазмидные штаммы, а также дифференцировать вид *B. anthracis* от близкородственных сапрофитов рода *Bacillus.*

Традиционно к роду *Francisella* относят 2 вида: *F. tularensis* и *F. philomiragia*, однако в последнее время появились публикации, в которых изучены заболевания, вызванные новыми видами франциселл: *F. hispaniensis, F. asiatica* и *F. noatunensis* (syn. *F. piscicida*) [260, 345, 433]. Внутри вида *F. tularensis* различают 4 подвида: *tularensis, holarctica, mediasiatica* и *novicida.* Внутривидовые различия *F. tularensis* более значительные, чем внутри видов *B. anthracis* и *Y. pestis*, что может говорить о значительно более раннем происхождении туляремийного микроба. Наиболее вирулентны штаммы, относящиеся к подвидам *tularensis, holarctica* и *mediasiatica*. Штаммы, относящиеся к виду *F. philomiragia* и подвиду *F. tularensis* subsp. *novicida*

патогенны только для людей с ослабленным иммунитетом. При обнаружении туляремийного микроба в биологическом материале и объектах окружающей среды имеет большое значение определение эпидемиологической значимости выделенного штамма, то есть возможность отличать патогенные подвиды *F. tularensis* subsp. *tularensis, F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* от непатогенных видов и подвида *F. novicida*.

Высокая контагиозность, летальность, достигающая 100%, при легочных формах заболеваний, а также общие клинические признаки острого респираторного заболевания на начальном этапе вызывают необходимость различать заболевания, вызванные *Y. pestis, B. anthracis* и *F. tularensis,* и как можно быстрее диагностировать патогены для применения эффективных методов лечения и предотвращения эпидемических вспышек.

Для диагностики каждой инфекции применяют бактериологические, культурально-морфологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы исследования. Кроме ограниченной чувствительности, несмотря на применение высококачественных питательных сред, недостатком культурального метода является его продолжительность и высокая трудоемкость, связанная с опасными манипуляциями с биопробными животными и высокими концентрациями живых культур.

Метод ПЦР в реальном времени обладает более высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет сократить время анализа, количественно оценивать содержание возбудителя в образцах и проводить анализ с микроколичеством образца в режиме закрытой пробирки, что значительно снижает риск контаминации. Отсутствие необходимости пост-амплификационных манипуляций с продуктами ПЦР позволяет также существенно сократить трудоемкость исследований. Все эти особенности обусловливают его преимущество относительно метода стандартной ПЦР. Несомненно, более существенные преимущества имеет ПЦР в реальном времени в мультилокусном варианте, в котором за счет одновременной амплификации нескольких ДНК-мишеней можно одномоментно провести индикацию нескольких возбудителей

либо охарактеризовать возбудитель по ряду признаков (вирулентность, эпидемическая значимость, таксономическое положение).

Целью создания заявленной тест-системы является повышение эффективности диагностических исследований за счет одновременного выявления хромосомной ДНК трёх видов особо опасных бактерий, независимо от плазмидного профиля штаммов, а также дифференциации штаммов *Y pestis*, *B. anthracis* и *F. tularensis* от близкородственных видов.

2.1.1 Обоснование выбора праймеров и зондов

Важным этапом при разработке ПЦР тест-систем является подбор мишеней для детекции возбудителя. Ген *ypo*2088 был идентифицирован с помощью сравнительной геномной гибридизации как хромосомный участок, специфический для вида *Y. pestis*, который не был найден ни в одном из исследованных в работах штаммах *Y. pseudotuberculosis* или *Y. enterocolitica* [338, 492].

Хромосомный ген *ssp* спор присутствует у всех бацилл, однако последовательность его имеет различия, достаточные для дифференциации сибиреязвенного микроба от близкородственных видов бацилл группы *B. cereus* [266, 288].

В геномах штаммов вида *F. philomiragia* и подвида *F. tularensis* subsp. *novicida* отсутствует последовательность элемента вставки *ISFtu*5, поэтому использование данного маркера позволяет обнаруживать только вирулентные для человека подвиды вида *F. tularensis* [140]. Предлагаемый способ включает амплификацию специфичных хромосомных последовательностей ДНК видов *Y. pestis*, *B. anthracis* и *F. tularensis*, что позволяет определять данные виды с любым набором плазмид и бесплазмидные штаммы, а также отличать возбудителей особо опасных инфекций от близкородственных видов.

В результате тщательной проверки качества определения нуклеотидных последовательностей были выведены следующие консенсусные

последовательности фрагментов генов: *ypo2088 Y. pestis*, *sspE B. anthracis* и IS*Ftu5 F. tularensis*.

На основании последовательностей выбранных фрагментов генов *ypo* 2088 *Y. pestis*, *sspE B. anthracis*, IS*Ftu5 F. tularensis* с помощью программы Primer Premier-V5 (Premier Bio Soft International) и алгоритма BLAST были подобраны олигонуклеотидные праймеры, обеспечивающие амплификацию фрагментов указанных локусов размером 138 п.н., 102 п.н., 128 п.н., соответственно. Выбор праймеров осуществляли с учетом возможности их использования в мультиплексной ПЦР с регистрацией результатов в режиме «реального времени», а гибридизационные зонды формата Taq Man подбирали в онлайн-режиме на интернет-сайте www.genscript.com. Указанные последовательности представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Последовательности праймеров и зондов

Название гена	Последовательность
Yp_ypo2088_up	cga-gta-ggg-tta-ggt-ggg
Yp_ypo2088_low	ccg-tcc-aat-gca-tgt-tag-acc-a
Yp_ypo2088_Pr_up	(ROX)tc-cat-ttc-atg-gcg-gta-ata-tcg-gga-(RTQ2)
sspE_up	agc-aaa-cgc-aca-atc-aga-ag
sspE_low	acg-tct-gtt-tca-gtt-gca-aat-tct-gta-cc
sspE_Pr_up	(FAM)ct-ggt-gct-agc-att-caa-agc-aca-aat-gct-(BHQ1)
ISFtu5_up	gcc-gtg-tga-act-tta-ctt-tgg-t
ISFtu5_low	tcc-tcg-tgt-aca-gag-cga-atc
ISFtu5_Pr_up2	(R6G)ac-ggt-cgt-tgt-gta-aaa-atc-aac-cac-atc-(RTQ2)

2.1.2 Подбор условий амплификации

Экспериментально установлен оптимальный состав реакционной смеси для выполнения мультиплексной ПЦР**.** В ПЦР-смеси подобранные концентрации праймеров и зондов составили 5 пмоль и 3 пмоль, соответственно, количество фермента Taq-полимеразы в концентрации 2,5 ед. достаточно для обеспечения высокой специфичности и эффективности проведения реакции.

Экспериментально подобран режим отжига праймеров и эффективное число циклов амплификации (таблица 11).

Таблица 11 – Условия амплификации

№	Этап	Температура	Время	Количество циклов
1	Первоначальный прогрев реакционной среды	95 °С	5 мин	
2	Этап 1	62 °С	40 с	50
3	Этап 2	95 °С	15 с	50

2.1.3 Оценка аналитической специфичности

Предварительная оценка аналитической специфичности используемых праймеров и зондов с помощью on-line алгоритма BLAST показала отсутствие гомологии выбранных последовательностей с другими микроорганизмами при уровне значимости E=10.

Для экспериментальной оценки чувствительности и специфичности мультиплексной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени использовали количественно охарактеризованные разведения ДНК *Y. pestis, F. tularensis* и *B. anthracis* в концентрации 1×10^3-1×10^8 м.к./мл (таблица 12).

В таблице результатов фиксировали значения порогового цикла (Ct) для каждой пробы. Определение видовой принадлежности исследуемых культур проводили на основании регистрации сигналов по каналам FAM, HEX и ROX.

В пробах 1, 2 и 3 есть рост флуоресценции по каналу ROX, соответствующий наличию ДНК культуры *Y. pestis* EV76 и нет роста флуоресценции на каналах FAM и HEX (таблица12, рисунок4а). В пробах 4, 5, 6 и 7 есть рост флуоресценции по каналу FAM, соответствующий наличию ДНК культуры *B. anthracis* СТИ-1, и нет роста флуоресценции на каналах ROX и HEX (таблица12, рисунок4б). В пробах 8, 9 и 10 есть рост флуоресценции по каналу HEX, соответствующий наличию ДНК культуры *F. tularensis* 15, и нет роста флуоресценции на каналах FAM и ROX (таблица12, рисунок4в).

Таблица 12 – Количественно охарактеризованные разведения ДНК *Y.pestis*, *F. tularensis* и *B. anthracis* для экспериментальной оценки чувствительности и специфичности

№	Название штамма	Разведение	Значения порогового цикла (Ct) по каналу:		
			FAM	R6G	ROX
1	*Y. pestis* subsp. *pestis* EV76	1×10^3 м.к./мл	-	-	37,06
2	*Y. pestis* subsp. *pestis* EV76	1×10^4 м.к./мл	-	-	34,0
3	*Y. pestis* subsp. *pestis* EV76	1×10^5 м.к./мл	-	-	31,35
4	*B. anthracis* СТИ-1 ($pX01^+/pX02^-$)	1×10^5 м.к./мл	26,08	-	-
5	*B. anthracis* СТИ-1 ($pX01^+/pX02^-$)	1×10^6 м.к./мл	22,61	-	-
6	*B. anthracis* СТИ-1 ($pX01^+/pX02^-$)	1×10^7 м.к./мл	19,26	-	-
7	*B. anthracis* СТИ-1 ($pX01^+/pX02^-$)	1×10^8 м.к./мл	16,15	-	-
8	*F. tularensis* subsp.*holarctica* 15	1×10^3 м.к./мл	-	34,69	-
9	*F. tularensis* subsp.*holarctica* 15	1×10^4 м.к./мл	-	31,5	-
10	*F. tularensis* subsp.*holarctica* 15	1×10^5 м.к./мл	-	28,87	-
11	К+		28,93	31,98	29,03
12	К-		-	-	-

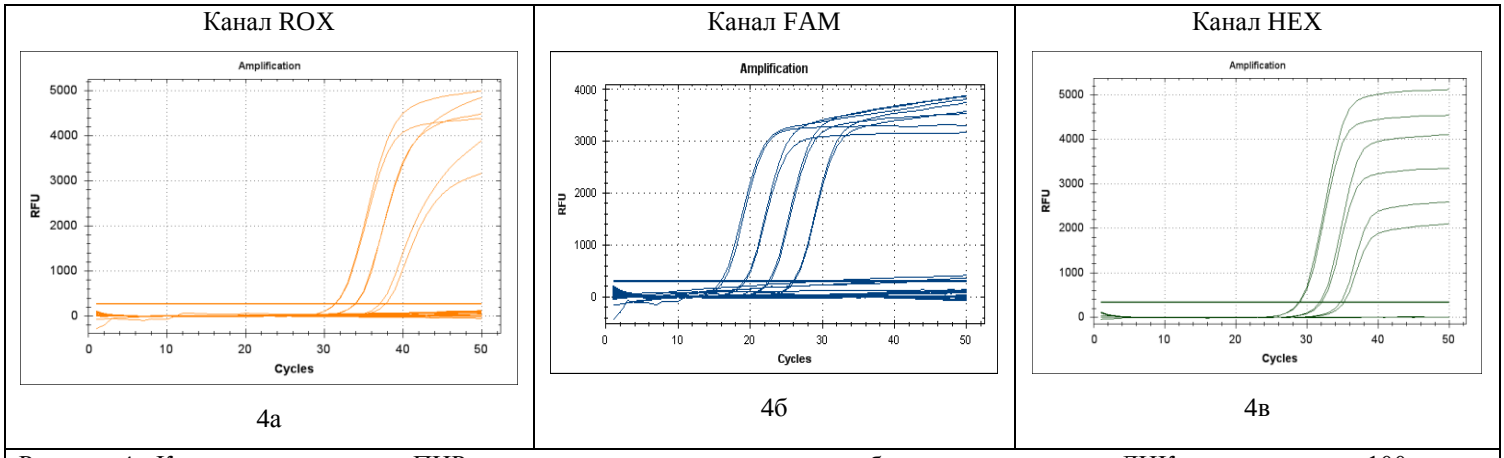


Рисунок 4 - Кинетические кривые ПЦР в режиме реального времени для образцов, содержащих ДНК, выделенные из 100 мкл бактериальных суспензий: 4а – штамма *Y. pestis* EV с концентрациями 1×10^5 м.к./мл (Ct по каналу ROX - 31.4, 31.3), 1×10^4 м.к./мл (Ct по каналу ROX - 34.0, 33.9) и 1×10^3 м.к./мл (Ct по каналу ROX - 37.1, 37.8), 4б – штамма *B. anthracis* СТИ-1 с концентрациями 1×10^8 м.к./мл (Ct по каналу FAM - 16,3, 15,99), 1×10^7 м.к./мл (Ct по каналу FAM - 19,34,19,17), 1×10^6 м.к./мл (Ct по каналу FAM - 22,72, 22,49) и 1×10^5 м.к./мл (Ct по каналу FAM - 26,15, 26,0), 4в – штамма *F. tularensis* 15 с концентрациями: 1×10^5 м.к./мл (Ct по каналу R6G (HEX) - 29,0, 28,9), 1×10^4 м.к./мл (Ct по каналу R6G - 32,1, 31,9) и 1×10^3 м.к./мл (Ct по каналу R6G(HEX) - 35.2, 34,9)

2.1.4 Проверка зашифрованных проб набором для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов

Для проверки работы набора штаммы были получены из «ГКПМ-Оболенск», из которых были приготовлены бактериальные взвеси клеток, выросших на плотной питательной среде, в 2 мл 0,9 % стерильного раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ГИСК им.Л.А.Тарасевича (ОСО 42-28-59-85П), что соответствует 5×10^9 м.к./мл для *F. tularensis*, 1×10^9 м.к./мл для *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *E. coli* и 1×10^8 м.к./мл для *B. anthracis* и *B. cereus*. Было подготовлено 9 проб, которые были промаркированы в соответствии с протоколом исследования от №1 до №9 и две пробы, содержащие положительный и отрицательный контроль амплификации (таблица13).

Таблица 13 – Штаммы микроорганизмов для характеристики специфичности набора.

№	Название штамма	Доза
1	*Y. pestis* subsp. *altaica* И3446	1×10^4 м.к./мл
2	*Y.pseudotuberculosis* 1779	1×10^7 м.к./мл
3	*B. anthracis* ΔAmes (pX01$^-$/pX02$^+$)	1×10^4 м.к./мл
4	*B. anthracis* СТИ-1 Rif 4 (pX01$^-$/pX02$^-$)	1×10^4 м.к./мл
5	*B. cereus* 504	1×10^7 м.к./мл
6	*F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu	1×10^4 м.к./мл
7	*F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 120	1×10^4 м.к./мл
8	*F. tularensis* subsp. *novicida* 112 Nov	1×10^5 м.к./мл
9	*Escherichia coli* JM83	1×10^7 м.к./мл
10	К+	
11	К-	

Мультиплексную ПЦР осуществляли в двух повторах для каждой исследуемой пробы или контрольного образца. Подготовленные микропробирки

помещали в термоциклер типа «CFX96» BIO-RAD. Для работы с прибором «CFX96» BIO-RAD использовали программу Bio-Rad CFX Manager. Задавали соответствующую программу условий амплификации (таблица11).

Определение видовой принадлежности исследуемых культур на основании регистрации сигналов по каналам FAM, HEX и ROX представлены в таблице 14. Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, а цифровое значение порогового цикла «Ct» указано в соответствующей графе таблицы результатов на панели прибора. Пороговое значение Ct для положительных проб по каналам FAM, JOE, ROX составляет не более 50. При получении значения не более 50 результат считают положительным.

Таблица 14 – Результаты анализа зашифрованных проб

№	Значения порогового цикла (Ct) по каналу:			Результат
	FAM	R6G (HEX)	ROX	
1	-	-	33,28	Есть ДНК *Y. pestis*
2	-	-	-	Нет
3	30,76	-	-	Есть ДНК *B. anthracis*
4	31,06	-	-	Есть ДНК *B. anthracis*
5	-	-	-	Нет
6	-	32,07	-	Есть ДНК *F. tularensis*
7	-	31,98	-	Есть ДНК *F. tularensis*
8	-	-	-	Нет
9	-	-	-	Нет
К+	28,93	31,98	29,03	Есть ДНК *Y. pestis, B. anthracis* и *F. tularensis*
К-	-	-	-	Нет

После расшифровки проб полученные результаты во всех случаях совпадали с характеристиками штаммов, использованных для приготовления шифрованных

проб, при изучении их в бактериологических, серологических и биологических методах.

В пробе 1 есть рост флуоресценции по каналу ROX, соответствующий наличию ДНК культуры *Y. pestis* subsp. *altaica* И3446 и нет роста флуоресценции по каналам FAM и HEX.

В пробе 2 нет роста флуоресценции по каналам FAM, HEX и ROX, что означает отсутствие ДНК культур *Y. pestis, B. anthracis* и *F. tularensis.* Близкородственный к чумному вид *Y.pseudotuberculosis* данными праймерами не определяется.

В пробах 3 и 4 есть рост флуоресценции по каналу FAM, соответствующий наличию ДНК культур *B. anthracis* ΔAmes и бесплазмидного штамма СТИ-1 Rif 4, и нет роста флуоресценции на каналах ROX и HEX, что означает – ДНК чумного и туляремийного микроба данными праймерами не определяется.

В пробе 5 нет роста флуоресценции по каналам FAM, HEX и ROX, что означает отсутствие ДНК культур *Y. pestis, B. anthracis* и *F. tularensis.* Близкородственный к сибиреязвенному вид *B. cereus* (штамм *B. cereus* 504) данными праймерами не определяется.

В пробах 6 и 7 есть рост флуоресценции по каналу HEX, соответствующий наличию ДНК культур *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 120, и нет роста флуоресценции на каналах ROX и FAM, что означает отсутствие ДНК чумного и сибиреязвенного микробов.

В пробе 8 нет роста флуоресценции по каналам FAM, HEX и ROX, что означает отсутствие ДНК культур *Y. pestis, B. anthracis* и *F. tularensis.* Штаммы подвида *F. tularensis* subsp. *novicida* не являются эпидемически значимыми, не несут определяемого данным набором гена элемента вставки ISFtu5 и поэтому данными праймерами не определяются.

В пробе 9 нет роста флуоресценции по каналам FAM, HEX и ROX, что означает отсутствие ДНК культур *Y. pestis, B. anthracis* и *F. tularensis.* Вид *E. coli* JM 83 данными праймерами не определяется

Таким образом, показано, что выбраные ДНК-мишени хромосомной локализации – последовательности фрагментов генов *ypo2088 Y. pestis*, *sspE B. anthracis* и IS*Ftu5 F. tularensis*, подобранные праймеры и гибридизационные зонды, оптимальный состав реакционной смеси и условия проведения реакции для выполнения мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени», особенности учета и оценки результатов позволяют выявлять возбудителей трёх видов особо опасных инфекций независимо от плазмидного состава штаммов, а также достигать высокого уровня чувствительности и специфичности, сокращать время анализа.

В результате проведенной оценки установлено, что выбранные праймеры и зонды для детекции возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов обладают высокой диагностической чувствительностью (доля правильных положительных результатов при концентрации 1×10^{4} м.к./мл не менее 90 %) и диагностической специфичностью (доля правильных отрицательных результатов - не менее 90 %).

2.2. Создание праймера Chi1f для дифференциации подвидов туляремийного микроба

Было предложено внутривидовое типирование туляремийного микроба методом ПЦР, в котором инициатором амплификации являются короткие нуклеотидные повторяющиеся chi-последовательности, рассеянные по геномной ДНК. Данные chi-последовательности обнаружены у микроорганизмов различных классов, в том числе и у *F. tularensis,* узнаются специфической нуклеазой и служат стимуляторами репарации структуры ДНК или точками гомологичной рекомбинации. Сравнительный анализ индивидуальных электрофоретических профилей ампликонов, ограниченных повторяющимися chi-последовательностями ДНК, позволяет проводить внутривидовую дифференциацию штаммов *F. tularensis*.

2.2.1 Создание системы из одного праймера для дифференциации подвидов туляремийного микроба на основе специфических регионов хромосомы, фланкированных chi – последовательностями, подобными *E. coli*

Нами был сконструирован праймер Chi1f 5`CTAGG-GCTGGTGG-G 3`, основа которого состояла из последовательности chi-сайта *E. coli* 5`GCTGGTGG 3`, а также из фланкирующих нуклеотидов: на 5`-конце CTAGG- и одного нуклеотида -G на 3`-конце [6]. Сконструированный праймер позволил провести методом ПЦР внутривидовую дифференциацию *F. tularensis* путем сравнения электрофоретической подвижности полученных ампликонов у штаммов туляремийного микроба, принадлежащих различным подвидам.

2.2.2 Результаты испытаний ПЦР с использованием одного праймера Chi1f для дифференциации подвидов туляремийного микроба

Электрофоретический анализ ампликонов, полученных с помощью праймера Chi1f (5`CTAGG-GCTGGTGG-G 3`) на ДНК-матрицах штаммов *F. tularensis* различного географического происхождения выявил характерное распределение полос по интенсивности и размерам (от ~100 п.о. до ~2000 п.о.), рисунок 5. Визуальное сравнение картины распределения ампликонов позволяет выделить пять характерных областей электрофореграмм: ~190, ~280, ~500–570, ~830, ~950 п.о.

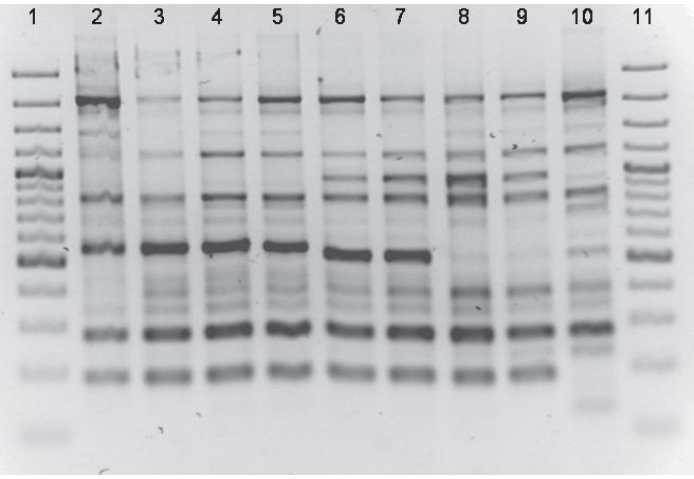


Рисунок 5 – Электрофореграмма ампликонов, полученных в ПЦР с праймером Chi 1f и ДНК штаммов *F. tularensis* различного географического происхождения

Примечание: 1,11 – GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder; 2 – subsp. *holarctica* 15; 3 – subsp. *holarctica* 503; 4 – subsp. *holarctica* bv. japonica Miura; 5 – subsp. *holarctica* bv. japonica Jasoe; 6 – subsp. *tularensis* 8859; 7 – subsp. *tularensis* Schu; 8 – subsp. *mediasiatica* 120; 9 – subsp. *mediasiatica* 117; 10 – subsp. *novicida* Utah 112

Для оптимизации информативности получаемых электрофореграмм был проведен сравнительный анализ распределения ампликонов по интенсивности и размерам при различных температурах отжига праймеров на молекуле ДНК. В качестве матриц в этих экспериментах использовалась ДНК из штаммов туляремийного микроба различной подвидовой принадлежности – subsp. *tularensis* Schu, subsp. *holarctica* 503, subsp. *mediasiatica* 120. Наиболее яркая картина распределения фрагментов ДНК в геле была получена при температуре отжига 54 °С. Все дальнейшие эксперименты проводили при данной температуре.

Для подтверждения уникальности электрофореграмм ампликонов, синтезируемых на матрицах *F. tularensis* с помощью праймера Chi1f, были использованы ДНК ряда микроорганизмов: *S. enteritidis, Y. pestis* EV линии НИИЭГ, *E. coli* JM83 (рисунок 6).

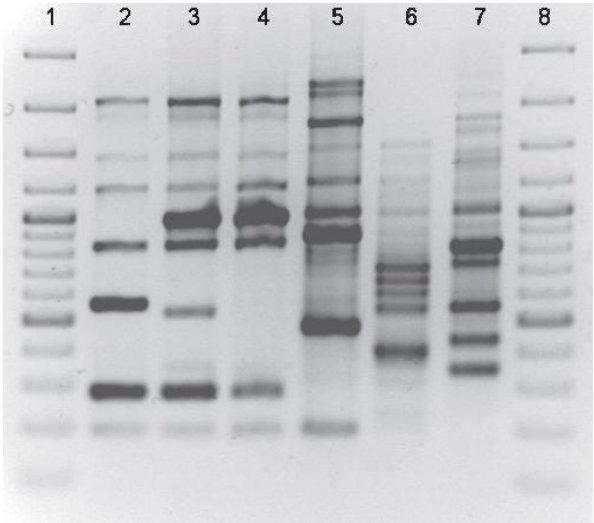


Рисунок 6 – Электрофореграмма ампликонов, полученных в ПЦР с праймером Chi1f и ДНК различных видов микроорганизмов.

Примечание: 1–8 – GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder; 2 – *F. tularensis subsp. holarctica* 503; 3 – *F. tularensis subsp. tularensis* Schu; 4 – *F. tularensis subsp. mediasiatica* 120; 5 – *S. enteritidis;* 6 – *Y. pestis* EV76; 7 – *E. coli* JM83

Представленная на рисунках 5 и 6 картина распределения ампликонов по подвижности и интенсивности позволяет сделать предположение, что праймер Chi1f можно использовать не только для внутривидовой дифференциации *F. tularensis*, но и, в определенных рамках, для межвидового и родового типирования генетического материала.

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования одного праймера для внутривидовой дифференциации *F. tularensis.* Предлагаемый

праймер, на наш взгляд, позволяет проводить не только внутривидовую дифференциацию *F. tularensis*, но также определять однородность исследуемой ДНК на возможность присутствия генетического материала других микроорганизмов. Картина распределения ампликонов ПЦР ДНК *F. tularensis* различных подвидов с использованием праймера Chi1f свидетельствует о существенном отличии подвида *novicida* от других подвидов (таблица 15). Уникальное сходство ампликонов размером ~950 п.о., полученных с использованием ДНК штаммов подвидов *mediasiatica* и *nearctica*, согласуется со схожестью этих подвидов по ряду биохимических свойств (ферментация глицерина и продукция цитруллинуреидазы).

Таблица 15 – Распределение диагностически значимых ампликонов по размерам для штаммов различных подвидов *F. tularensis*

Подвид	Штамм	Размер ампликона, п.о.					
		~191	~279	~500	~558	~829	~975
tularensis	Schu	+	+	+	-	+	+
	8859	+	+	+	-	+	+
	B399	+	+	+	-	+	+
holarctica	15	+	+	-	+	+	-
	503	+	+	-	+	+	-
	21/400	+	+	-	+	+	-
holarctica	Jasoe	+	+	-	+	+	-
bv. japonica	Miura	+	+	-	+	+	--
mediasiatica	117	+	+	-	-	+	+
	120	+	+	-	-	+	+
novicida	Utah 112	-	+	-	-	+	-

2.3 Генотипирование штаммов туляремийного микроба

Применение праймера Chi1f в ПЦР-диагностике может использоваться для подвидовой дифференциации туляремийного микроба [6]. Однако данный метод не позволяет внутри подвида отнести исследуемый изолят к определенному генетическому кластеру, что затрудняет как выявление связи с эндемичными штаммами туляремийного микроба, так и локализацию распространения конкретных штаммов в эндемичных по туляремии районах. Детальное расследование вспышек заболевания для выявления источника инфекции в настоящее время затруднительно без комплекса молекулярно-биологических

методов, способных однозначно относить выделенные изоляты к определенному подвиду и внутри подвида к определенному генетическому кластеру, что исключительно важно в свете требований современного здравоохранения и реальной угрозы биотерроризма. В настоящее время для внутривидового типирования бактерий *F. tularensis* широко применяется метод мультилокусного анализа числа тандемных повторов (MLVA) [274]. Генотипирование методом VNTR по 25 локусам, проведенное шведскими исследователями на 192 штаммах, позволило различить 120 групп различных генотипов.

На территории бывшего Советского Союза в основном обнаруживаются штаммы подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica*. А. С. Водопьянов [7] провел анализ 352 штаммов возбудителя туляремии методом VNTR по четырем локусам, что позволило выявить 61 генотип, продемонстрировав генотипическую гетерогенность российских штаммов. Следует отметить, что такое малое количество локусов затрудняло даже подвидовую дифференциацию.

Проведенный нами анализ 68 штаммов по 25 локусам выявил среди них 51 различный генотип [89]. На момент исследований в коллекции «ГКПМ-Оболенск» насчитывалось более 150 штаммов *F. tularensis,* в том числе и вновь выделенных природных изолятов. Нами была поставлена задача изучения генетического разнообразия и установления филогенетических связей между исследуемыми штаммами методом MLVA по 25-ти VNTR локусам, предложенным A. Johansson [274], который считается в настоящее время оптимальным по соотношению трудозатрат и разрешающей способности.

2.3.1 Изучение генотипического разнообразия штаммов *F. tularensis* из коллекции ГНЦ ПМБ методом MLVA -типирования по 25 VNTR-локусам

Размеры ампликонов определяли, сравнивая их электрофоретическую подвижность с подвижностью молекулярных маркеров в агарозном геле различной плотности. Такая методика не позволяет определить размер ампликона с точностью до одного нуклеотида, однако размер одной копии тандемного повтора в большинстве анализируемых локусов составляет от 5 до 26 п.о., что находится в пределах разрешения при описанном подходе. Основываясь на

последовательностях аннотированного генома штамма SCHU S4, мы рассчитали, как соотносится размер ампликона с кратностью тандемного повтора для каждого локуса. Результаты приведены в таблице 16. Для локусов Ft-M1 и Ft-M25 размер копии тандемного повтора составляет 2 и 3 п.о., соответственно, и выходит за пределы разрешения электрофоретического разделения продуктов амплификации, поэтому ампликоны данных локусов секвенировали, и кратность их повторов определялась прямым подсчетом.

Определяя размер ампликона, для дальнейшего анализа мы заменяли его истинный размер в нуклеотидах на количество содержащихся в нем копий повтора, согласно таблице.

В случае, если размер полученного нами ампликона был меньше расчетного размера одной копии локуса, данный ампликон вне зависимости от размера делеции и того, затрагивает ли она область, содержащую тандемные повторы, или область, фланкирующую их, считался содержащим 0 повторов.

Полученные данные использовали для построения филогенетического дерева по алгоритму UPGMA с помощью программы Bio Numerics, что позволило нам проанализировать филогенетические отношения штаммов, представленных в «ГКПМ-Оболенск», в том числе переданных в нее из ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае», Иркутского НИПЧИ, ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» (последние были представлены лишь препаратами ДНК), а также выделенных при эпидемиологическом расследовании вспышки туляремии в Ханты-Мансийске в 2013 г. (таблица 5). Подвидовая принадлежность исследуемых штаммов либо была заранее известна, либо определена предварительно с помощью однопраймерного типирования. Результаты однопраймерного типирования были подтверждены данными биохимического анализа. Для MLVA типирования были проанализированны 159 subsp штамма *F. tularensis* и один штамм *F. philomiragia*. Штаммы *F. tularensis* распределялись по подвидам следующим образом:

– subsp. *novicida* и *novicida*-like - 3 штамма;

– subsp. *tularensis* - 6 штаммов;

– subsp. *mediasiatica* - 10 штаммов;

– subsp. *holarctica* - 140 штаммов, из них 5 штаммов японского биовара.

Географически все исследованные штаммы *F. tularensis* можно условно отнести к следующим регионам:

– Центральная и Северная Европа (включая Северо-Западную часть России – Ленинградскую и Мурманскую области);

– Московская область;

– Южный регион – Поволжье, Крым, Северный Кавказ, Украина, Северный Казахстан ;

– Южная и Восточная Сибирь - Алтайский Край, Иркутская область, юг Красноярского края;

– Западная Сибирь (Ханты-Мансийский Автономный Округ);

– Дальний Восток (Сахалин);

– Средняя Азия;

– Япония;

– Северная Америка и Канада.

Кроме этого, один штамм был выделен в Турции, два – в Болгарии, один – в Молдавии, а для девяти штаммов сведений о месте выделения не сохранилось.

Таблица 16 (1 часть) - Соответствие размера ампликона кратности тандемных повтором для локусов Ft-M1 - Ft-M25. Цветом выделены ампликоны, полученные *in silico* с соответствующими праймерами для штамма SCHU S4. Размер аллеля с 1 по 15

Локус	Последовательность	Раз-мер пов торап .о.	SCHU S4		Размер аллеля (с 1 по 15) при соответствующем количестве единиц, п.о.														
			Кол-во копий	Раз мер	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ft-M1	AAT	3	3	310	304	307	**310**	313	316	319	322	325	328	331	334	337	340	343	346
Ft-M2	TAAATA	6	4	463	445	451	457	**463**	469	475	481	487	493	499	505	511	517	523	529
Ft-M3	AATAAGGAT	9	25	432	216	225	234	243	252	261	270	279	288	297	306	315	324	333	342
Ft-M4	TTGTT	5	3	434	424	429	**434**	439	444	449	454	459	464	469	474	479	484	489	494
Ft-M5	TTTCTACAAATATCTT	16	3	208	176	192	**208**	224	240	256	272	288	304	320	336	352	368	384	400
Ft-M6	TTGGTGAACTTTCTTGCTCTT	21	4	311	248	269	290	**311**	332	353	374	395	417	438	459	480	501	522	543
Ft-M7	TTTCTACAAATATCTT	16	4	207	159	175	191	**207**	223	239	255	271	287	303	319	335	351	367	383
Ft-M8	TTTCTACAAATATCTT	16	4	286	238	254	270	**286**	302	318	334	350	366	382	398	414	430	446	462
Ft-M9	TTTCTACAAATATCTT	16	4	248	200	216	232	**248**	264	280	296	312	328	344	360	376	392	408	424
Ft-M10	TTTCTACAAATATCTT	16	18	617	329	345	361	377	393	409	425	441	457	473	489	505	521	537	553
Ft-M11	AATTATAAAT	10	5	392	352	362	372	382	**392**	402	412	422	432	442	452	462	472	482	492
Ft-M12	TAGCTTTTTT	10	2	345	335	**345**	355	365	375	385	395	405	415	425	435	445	455	465	475
Ft-M13	CTCCAGGACCAA	12	2	325	313	**325**	337	349	361	373	385	397	409	421	433	445	457	469	481
Ft-M14	TCATTA	6	3	442	430	436	**442**	448	454	460	466	472	478	484	490	496	502	508	514
Ft-M15	ATACTT	6	2	222	216	**222**	228	234	240	246	252	258	264	270	276	282	288	294	300
Ft-M16	TAAAAGTAAG	10	2	221	211	**221**	231	241	251	261	271	281	291	301	311	321	331	341	351
Ft-M17	TATTTA	6	3	351	339	345	**351**	357	363	369	375	381	387	393	399	405	411	417	423
Ft-M18	CATTAA	6	4	372	354	360	366	**372**	378	384	390	396	402	408	424	420	426	432	438
Ft-M19	TAAATTTCTCATA	13	2	316	303	**316**	329	342	355	368	381	394	407	420	433	446	459	472	485
Ft-M20	ATTATTTTGATC	12	3	255	231	243	**255**	267	279	291	303	315	327	339	351	363	375	387	399
Ft-M21	TCAATTA	7	3	403	389	396	**403**	410	417	424	431	438	445	452	459	466	473	480	487
Ft-M22	AAAAAT	6	2	242	236	**242**	248	254	260	266	272	278	284	290	296	302	308	314	320
Ft-M23	AAGTAGCATTGTCACGACCTCCT	23	2	435	412	**435**	458	481	504	527	550	573	596	619	642	665	688	711	734
Ft-M24	ATAAATTATTTATTTTGATTA	21	1	459	**459**	470	491	512	533	554	575	596	617				641	662	683
Ft-M25	GT	2	5	159	151	153	155	157	**159**	161	163	165	167	169	171	173	175	177	179

Таблица 16 (2 часть) - Соответствие размера ампликона кратности тандемных повтором для локусов Ft-M1 - Ft-M25. Цветом выделены ампликоны, полученные in silico с соответствующими праймерами для штамма Schu S4. Размер аллеля с 16 по 30

Локус	Последовательность	Раз-мер пов торап.о.	SCHU S4		Размер аллеля (с 16 по 30) при соответствующем количестве единиц, п.о.														
			Кол-во копий	Размер	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Ft-M1	AAT	3	3	310	349	352	355	358	361	364	367	370	373	376	379	382	385	388	391
Ft-M2	TAAATA	6	4	463	535	541	547	553	559	565	571	577	583	589	595	601	607	613	619
Ft-M3	AATAAGGAT	9	25	432	351	360	369	378	387	396	405	414	423	**432**	441	450	459	468	477
Ft-M4	TTGTT	5	3	434	499	504	509	514	519	524	529	534	539	**544**	549	554	559	564	569
Ft-M5	TTTCTACAAATATCTT	16	3	208	416	432	448	464	480	496	512	528	544	560	576	592	608	624	640
Ft-M6	TTGGTGAACTTTCTTGCTCTT	21	4	311	564	585	606	627	648	669	690	711	732	753	774	795	816	837	858
Ft-M7	TTTCTACAAATATCTT	16	4	207	399	415	431	447	463	479	495	511	527	543	559	575	591	607	623
Ft-M8	TTTCTACAAATATCTT	16	4	286	478	494	510	526	542	558	574	590	606	622	638	654	670	686	702
Ft-M9	TTTCTACAAATATCTT	16	4	248	440	456	472	488	504	520	536	552	568	584	600	616	632	648	664
Ft-M10	TTTCTACAAATATCTT	16	18	617	569	585	**617**	662	678	694	710	726	742	758	774	790	806	822	838
Ft-M11	AATTATAAAT	10	5	392	502	512	522	532	542	552	562	572	582	592	602	612	622	632	642
Ft-M12	TAGCTTTTTT	10	2	345	485	495	505	515	525	535	545	555	565	575	585	595	605	615	625
Ft-M13	CTCCAGGACCAA	12	2	325	493	505	517	529	541	553	565	577	589	601	613	625	637	649	661
Ft-M14	TCATTA	6	3	442	520	526	532	538	544	550	556	562	568	574	580	586	592	598	604
Ft-M15	ATACTT	6	2	222	306	312	318	324	330	336	342	348	354	360	366	372	378	384	390
Ft-M16	TAAAAGTAAG	10	2	221	361	371	381	291	401	411	421	431	441	451	461	471	481	491	501
Ft-M17	TATTTA	6	3	351	429	435	441	447	453	459	465	471	477	483	489	495	501	507	513
Ft-M18	CATTAA	6	4	372	444	450	456	462	468	474	480	486	492	498	504	510	516	522	528
Ft-M19	TAAATTTCTCATA	13	2	316	498	511	524	537	550	563	576	589	602	615	628	641	654	667	680
Ft-M20	ATTATTTTGATC	12	3	255	411	423	435	447	459	471	483	495	507	519	531	543	555	567	579
Ft-M21	TCAATTA	7	3	403	494	501	508	515	522	529	536	543	550	557	564	571	578	585	592
Ft-M22	AAAAAT	6	2	242	326	332	338	344	350	356	362	368	374	380	386	392	398	404	410
Ft-M23	AAGTAGCATTGTCACGACCTCCT	23	2	435	757	780	803	826	849	872	895	918	941	964	987	1010	1033	1056	1079
Ft-M24	ATAAATTATTTATTTTGATTA	21	1	459	704	725	746	767	788	809	830	851	872	893	914	935	956	977	998
Ft-M25	GT	2	5	159	181	183	185	187	189	191	193	195	197	199	201	203	205	207	209

В ходе филогенетического анализа коллекции по 25 локусам мы идентифицировали 127 индивидуальных геномов. Подвидовые различия MLVA-профилей соответствовали, в целом, описанным ранее [274] (таблица 17).

Таблица 17 – Диапазоны значений кратности тандемных повторов в каждом из 25 локусов у различных подвидов *F. tularensis*

Локус	Наши исследования					Johansson A., [105]				
	holarctica	*holarctica* bv. *japonica*	*tularensis*	*medi-asiatica*	*novicida*	*holarctica*	*holarctica* bv. *japonica*	*tularensis*	*medi-asiatica*	*novicida*
Ft-M1	3	3	3	4	3	3	3	3	4	3
Ft-M2	3	5-8	5-31	3-4	3-4	2	6-26	4-34	2	2
Ft-M3	0-27	3-4	16-25	7-63	32-35	8-28	3	7-29	25-28	30-43
Ft-M4	2-5	2-4	2-4	3-4	0-5	4-5	4	3	3	3-4
Ft-M5	0-2	2	2-3	0-12	0-2	2	2	2-6	6-10	2
Ft-M6	3-8	4-5	4	2-6	0-4	4-7	3-5	4-7	2-3	4
Ft-M7	2	2	2-4	1-6	0	2	2	2-6	2	2
Ft-M8	0-5	1	1-5	0-6	0-2	2	1-4	1-6	1	0
Ft-M9	2	2	2-5	2-3	0	2	2	2-15	3	2-7
Ft-M10	3	6-9	2-18	3	3	2	4-8	1-18	2	2
Ft-M11	5-6	5	5	2-4	3-5	5	5	5	3	4-5
Ft-M12	0-3	2	2	1	2	2	2	1-2	1-2	2
Ft-M13	0-1	1-2	1-2	0-1	1-2	1-2	1	1-2	1	1-2,5
Ft-M14	0-3	3		0-3	3	3	3	3	2	3
Ft-M15	0-3	3	0-2	3	3	3	3	2-3	3	3
Ft-M16	1	1	2	1	1	1-2	1	1-2	1	1
Ft-M17	1-3	2-3	2-3	1-2	2-3	2-3	2	2	2	2
Ft-M18	1-3	2-3	2	2	0-68	2-4	2	2-4	2	0-2
Ft-M19	1-2	1	4	4	3-4	1	1	2	2	2
Ft-M20	3-22	3-11	3-19	6-12	30	3-4	11-18	3-25	6-7	31-39
Ft-M21	1-4	1-2	2-8	1-2	0-3	3-5	3-5	3-7	3	3
Ft-M22	3-5	3	2-3	3-15	3	3-4	4	2-3	8-14	5
Ft-M23	1	1	1-2	1	0-1	1	1	1-2	1	1-1,5
Ft-M24	1-2	1	1-2	1	1	1-2	1	1	1	1
Ft-M25	4-5	4-5	5	4-5	4-5	4	5	5	5	5

Как видно из приведенной таблицы, диапазон значений кратности повторов во многих локусах в нашей работе был несколько шире, в основном благодаря

отдельным штаммам с аномальным размером локусов. Также обращает на себя внимание тот факт, что в локусе Ft-M10 был выявлен на 1 повтор больше, чем в работе [274]. Это несовпадение можно объяснить различием в используемой для определения размеров ампликонов методике – A. Johansson с соавторами получали флюоресцентно меченные ампликоны и определяли их истинный размер с помошью секвенатора ABI 377, в то время как мы определяли размер ампликонов по их электрофоретической подвижности в 3% агарозном геле по отношению к подвижности молекулярных маркеров.

Внутри дендрограммы все штаммы распределились согласно их подвидовой принадлежности, а внутри подвида *holarctica* (наиболее многочисленной выборки) – по группам. Таким образом, в полученном нами филогенетическом дереве мы выделили и описали следующие кластеры (рисунок 7; приложение 1) :

F. tularensis subsp. *novicida* и *novicida*-like;

F. tularensis subsp. *holarctica;*

F. tularensis subsp. *holarctica* группа Nevada;

F. tularensis subsp. *holarctica* Южно-Сибирский кластер;

F. tularensis subsp. *holarctica* Ханты-Мансийский кластер;

F. tularensis subsp. *holarctica* Ставропольско-Краснодарский кластер;

F. tularensis subsp. *holarctica* Московский кластер (лабораторные штаммы);

F. tularensis subsp. *holarctica* bv. *Japonica;*

F. tularensis subsp. *mediasiatica;*

F. tularensis subsp. *tularensis;*

F. philomiragia. Наибольшее количество исследованных штаммов принадлежит к голарктическому подвиду. Из 140 штаммов было выделено 108 индивидуальных генотипов.

Внутри данного подвида четко обособлены штаммы японского биовара. К этой группе относятся 5 штаммов, в том числе 3 с невыясненным местом выделения. 2 из этих штаммов обладают идентичным генотипом (N=5, G=4).

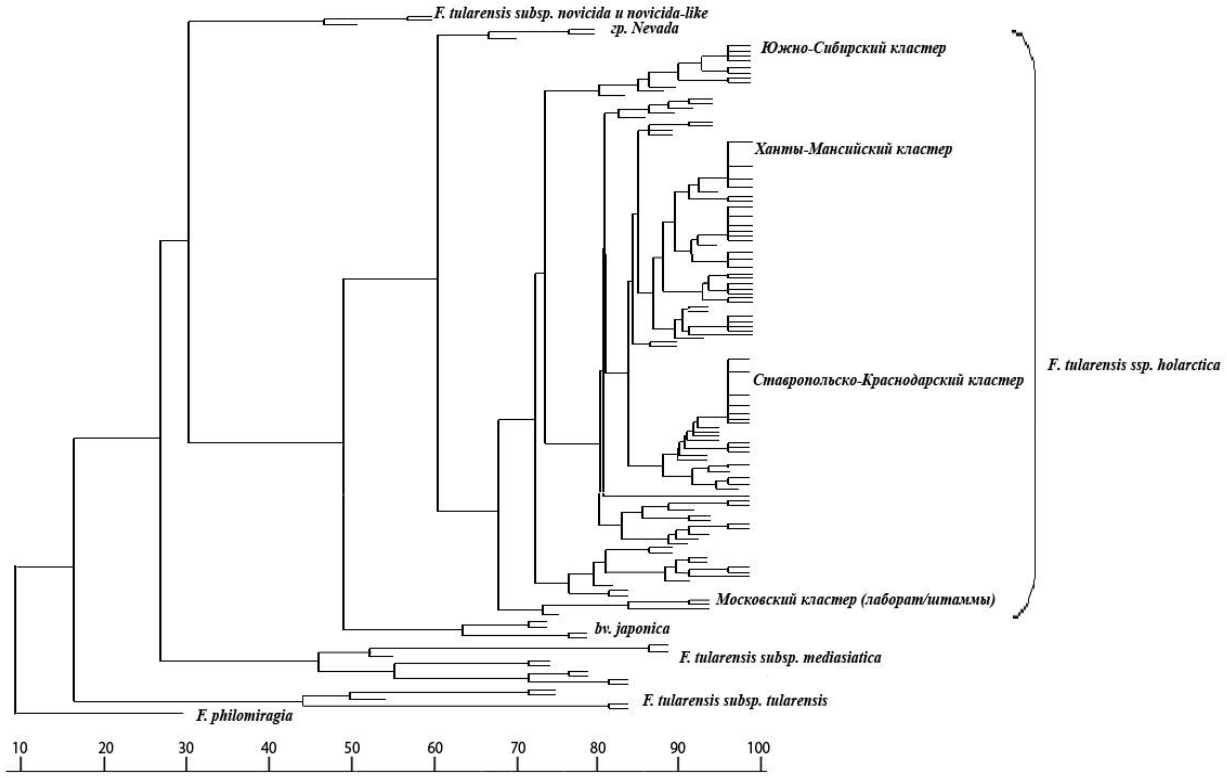


Рисунок 7 – Схематическое изображение дендрограммы, отображающей филогенетические связи исследуемых штаммов

Примечание: полная дендрограмма приведена в приложении 1.

Отдельный кластер (названный нами Невада) сформировали три штамма – Japonski Downs, 0/284 и Nevada 14 – MLVA-профили которых имели сходство как со штаммами голарктического (локусы Ft-M 7, Ft-M 9, Ft-M 13, Ft-M 16, Ft-M 17, Ft-M 18 Ft-M 22), так и неарктического подвидов (локусы Ft-M 2, Ft-M 10 и Ft-M 25).

На дендрограмме данный кластер занял промежуточное положение между японским биоваром и остальными штаммами голарктического подвида. Эти данные согласуются с результатами A. J. Vogler [473], который также отмечал наличие филогенетически обособленной группы штаммов в пределах голарктического подвида, занимающих промежуточное положение между японским биоваром и остальными штаммами subsp. *holarctica*. Однако следует отметить, что один из трех штаммов в кластере Невада – *F. tularensis* Nevada 14 – принадлежит не к подвиду *holarctica*, а к подвиду *tularensis*. Если исключить, крайне малую вероятность того, что штаммы разных подвидов могли независимо

приобретести сходные MLVA-профили, а также учитывать теорию о сравнительно позднем происхождении подвида *holarctica* от подвида *tularensis* либо их общего предка [274, 473], то можно предположить, что входящие в группу Невада штаммы действительно филогенетически родственны и представляют собой переходную между этими подвидами группу.

Дальнейший анализ филогенетического дерева позволил отметить, что большинство штаммов с территории Южной Сибири вошли в состав одного кластера благодаря распространенности у них делеций в локусах Ft-M5 и Ft-M12 и снижения кратности повторов в локусе Ft-M17 до 1. Исключением явились лишь четыре Южно-Сибирских штамма – I-346R, I-367R, I-364 и M-24 – MLVA-профили которых более схожи с усредненным профилем для подвида *holarctica*.

Интересно, что имеющие сходный генотип штаммы, формирующие южно-сибирский кластер, географически представлены двумя достаточно далеко друг от друга отстоящими ареалами – Иркутским и Барнаульским. Такое филогенетическое родство географически отдаленных штаммов, на наш взгляд, говорит о “белых пятнах” на огромной территории Южной Сибири вследствие ее малой заселенности и, как результат, недостаточной представленности штаммов туляремийного микроба из областей между Иркутским и Барнаульским ареалами. По данным настоящего исследования мы считаем, что есть основания отдельно выделить Южно-Сибирскую популяцию возбудителя туляремии подвида *holarctica*.

Другая часть штаммов голарктического подвида была выделена на южных территориях России (Ставропольский, Ростовский и Краснодарский регионы), частично на территориях Казахстана и Украины. Небольшую группу составили штаммы из других регионов, включая Центральный и Северный регионы России и некоторые страны Европы. Большинство этих штаммов в дендрограмме хоть и разделяются на определенные группы, однако проявляют значительно меньшее генетическое разнообразие и по большей части кластеризуются вне зависимости от географии места выделения. Это объясняется, во-первых, недостаточным для формирования отдельных кластеров количеством штаммов, выделенных не в

южных регионах, и, во-вторых, невысокой степенью вариабельности MLVA-профилей в пределах подвида *holarctica*.

Тем не менее, в соответствии с тезисом о клональной структуре популяции возбудителя туляремии [424], штаммы из Западной Сибири, выделенные при эпидемиологическом расследовании вспышки туляремии в Ханты-Мансийске в 2013 г., сформировали отдельный кластер. Данные штаммы являются генетически идентичными по 24 VNTR-локусам, различаясь лишь по гипервариабельному локусу Ft-M3. Различия в длине этого локуса позволили разделить Ханты-Мансийские штаммы на четыре индивидуальных генотипа, содержащие 9, 10, 15 и 17 повторов. Штаммы, содержащие 15 повторов в локусе Ft-M3, составляют 50 % от общего числа. Данный генотип обнаружен как в штаммах, выделенных от людей (штаммы X-4, X-7, X-7-2, X-8K, X-8M), так и от грызуна бурозубки (штамм X-2/26), что указывает на общий источник их заражения. У остальных трех штаммов, выделенных от грызунов (X-1/23, X-1/25, X-3/23), обнаружено по 17 повторов в данном локусе. Наиболее близкими к этой группе штаммов является штамм I-365R, выделенный в Бурятии, и штаммы A-408 (217) и 401, выделенные в Казахстане.

Крупный кластер сформировали 45 штаммов, выделенных на территории Ставропольского и Краснодарского краев, при этом среди них выделено всего 22 индивидуальных генотипа (50 %), что говорит о высокой степени родства между штаммами данной группы.

Четыре представленных в коллекции лабораторных штамма – 15, 9, 503 и 21/400 – также сформировали обособленный кластер.

В связи с малочисленностью проанализированных в данном исследовании штаммов подвидов *tularensis* и *novicida* сделать какие-либо выводы о внутриподвидовой структуре этих подвидов не представляется возможным. Так, наличие в нашей коллекции всего 6 штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis* не позволяет проследить описанное в работе [274] разделение этого подвида на две подгруппы. Обращает на себя внимание, что штамм Nevada 14, будучи отмечен в паспорте, как принадлежащий к подвиду *tularensis*, тем не менее, по данным

MLVA типируется, как представитель подвида *holarctica*, что уже было отмечено выше.

2.3.2 Обнаружение на территории Алтайского края Российской Федерации *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*

Вторым по численности среди представленных штаммов является среднеазиатский подвид. Он представлен 10 штаммами, из которых выделяется 9 индивидуальных генотипов. Три штамма – А-554, А-678 и А-823 – поступили в ФБУН ГНЦ ПМБ в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за туляремией ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае» и были выделены на территории Алтайского края в 2011 г. (рисунок 8). До сих пор в научной литературе не встречались данные о распространении этого подвида на территории Российской Федерации и считалось, что он выделяется лишь в Средней Азии, что и обусловило его подвидовое название.

Рисунок 8 - Карта распространения штаммов *F. tularensis*, полученных из ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае» и Иркутского НИПЧИ

Примечание: Цифрами обозначены штаммы: 1 – I-346, I-347; 2 – I-382; 3 – I-365; 4 – I-329; 5 – I-349; 6 – I-282, I-305, I-373; 7 – I-388; 8 – I-387; 9 – A-823; 10 – A-678; 11 – A-1045; 12 – A-554; 13 – I-367.

Результаты MLVA о принадлежности этих штаммов к среднеазиатскому подвиду были подтверждены с помощью однопраймерного типирования [6]. В ПЦР с праймером Chi1f у всех изолятов выявляются ампликоны размерами ~279 и ~829 п.о., общие для бактерий вида *F. tularensis*, что подтверждает принадлежность исследуемых штаммов к виду *F. tularensis*, и ампликон размером ~975 п.о., специфичный для подвидов *mediasiatica* и *tularensis*, но отсутствует ампликон размером ~500 п.о., типичный для подвида *tularensis*, что позволяет отнести изучаемые изоляты к подвиду *mediasiatica*. (рисунок 9).

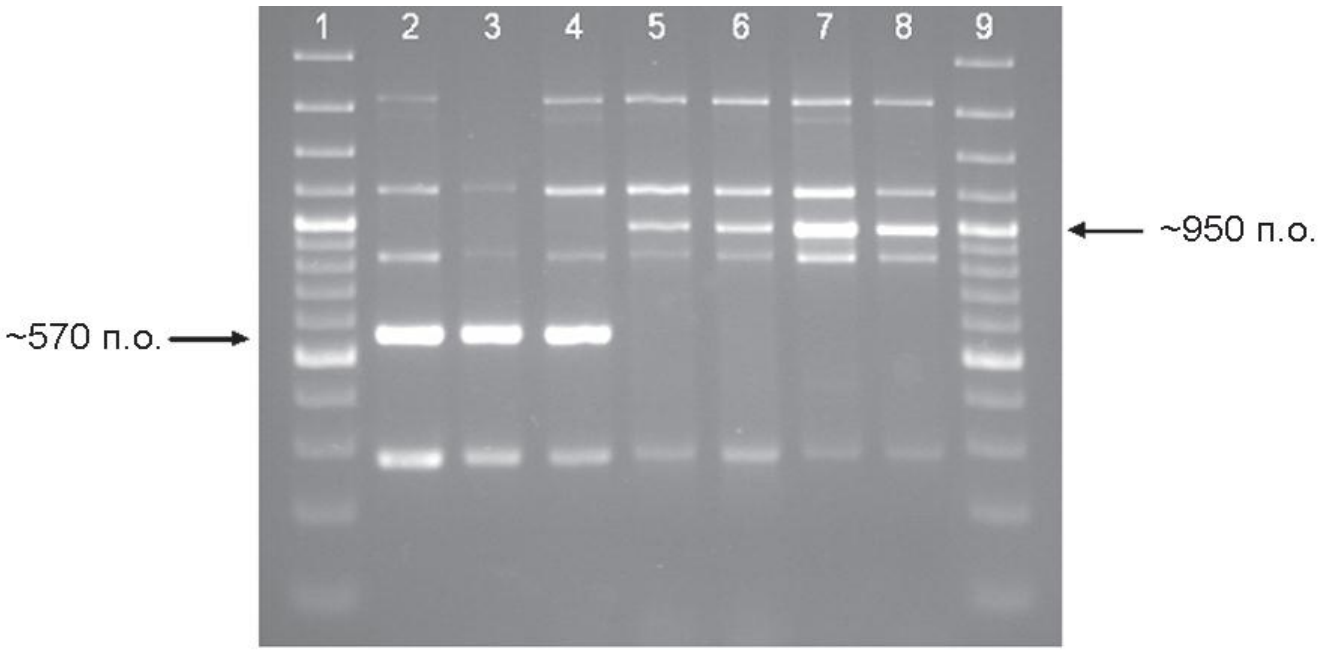


Рисунок 9 – Электрофореграмма ампликонов, полученных ПЦР с праймером Chi1f и ДНК *F. tularensis*

Примечание: Цифрами обозначены треки: 1, 9 – GeneRluerTM 100 bp Plus DNA Ladder; 2 – subsp. *holarctica* 15; 3 – subsp. *holarctica* 503; 4 – А-1045; 5 – А-554; 6 – А-678; *7* – А-823; 8 – subsp. *mediasiatica* 120.

Кроме того, о принадлежности данных штаммов к подвиду *mediasiatica* свидетельствуют такие фенотипические признаки, как отсутствие лактамазной активности в отношении бензилпенициллина и нитроцефина. Это демонстрирует наличие в Алтайском крае популяции *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, ареал распространения которой территориально перекрывается с западной частью ареала распространения сибирских штаммов голарктической расы туляремийного микроба

Штаммы А-554 и А-678 являются генетически идентичными по 25 VNTR-локусам. Штамм А-823 отличается от них по длине трех локусов (Ft-M3, Ft-M7 и Ft-M20), в том числе гипервариабельного локуса Ft-M3, позволяющего выявлять различия между близкородственными штаммами. По длине локусов Ft-M3 и Ft-M7 эти штаммы отличаются от остальных штаммов подвида *mediasiatica* большим количеством повторов – 47 и 63 в локусе Ft-M3 и 5 и 6 – в локусе Ft-M7. Различия в длине VNTR-локусов между штаммами А-554, А-678 и А-823 в целом меньше, чем с другими представленными в коллекции ФБУН ГНЦ ПМБ штаммами среднеазиатского подвида туляремийного микроба, что может говорить о генетической обособленности алтайской популяции *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. Следовательно, можно выдвинуть две альтернативные гипотезы – либо миграция *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* на территорию Алтайского края имела место относительно недавно, либо же ареал его распространения изначально был шире, чем предполагалось до недавнего времени, но этот факт не был обнаружен.

На наш взгляд довольно большая удаленность Алтайского края от типичного ареала обитания *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* (Южный Казахстан), генетическая обособленность исследованных изолятов от других штаммов этого подвида, а также достаточно большое число выделенных впоследствии в этом регионе изолятов среднеазиатского подвида (в данную работу не включены данные по 9 штаммам *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, переданных в нашу коллекцию из ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае» в 2012-2013 г.г.) свидетельствуют в пользу того, что данный подвид является эндемичным для Южной Сибири.

Приняв за отправную точку тезис о том, что разделение *F. tularensis* на подвиды *tularensis* и *holarctica* произошло на территории Северной Америки, откуда *F. tularensis* subsp. *holarctica* через Берингов пролив / Берингов перешеек проник в Старый Свет [274, 472], а также генетическое родство подвидов *mediasiatica* и *tularensis* и отсутствие среднеазиатского подвида в Америке, а подвида *tularensis* в Евразии (исключая единичные случаи его обнаружения в

Европе, которые могут обусловлены антропогенным заносом американских штаммов либо напрямую, либо с синантропной фауной), можно предположить, что *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* произошел от проникшего из Америки в Евразию *F. tularensis* subsp. *tularensis*, который, мигрируя на запад приобрел ряд генетических и фенотипических (сниженная вирулентность и отсутствие лактамазной активности) признаков, по которым его выделяют в подвид *mediasiatica*. В этом случае Алтайская популяция *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* должна быть эволюционно более древней, чем Среднеазиатская, так как находится значительно восточнее. Также, учитывая распространенность климато-географических условий, сходных с регионом выделения Алтайской популяции, можно предположить, что среднеазиатский подвид может быть распространен гораздо шире, чем предполагалось ранее. Глядя на карту, можно заметить, что между Алтаем и долинами Амударьи и Сырдарьи протянулась цепочка крупных озер, тянущаяся от Байкала через северную Монголию (Хубсугул, Увс-Нур, Хяргас-Нур, Хар-Ус-Нур, Дурген-Нуур), северо-запад Китая (Улюнгур), и Казахстан (Зайсан, Алакюль, Балхаш), перемежаемых более мелкими водоемами (рисунок 10).

Рисунок 10 – Карта региона, расположенного между ареалами распространения *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* с обозначением крупнейших водоемов

С учетом привязанности *F. tularensis* к водным биотопам можно предположить, что распространение *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* происходило

вдоль этой цепи водоемов. Наиболее вероятно, что проникновение микроорганизмов из Америки в Евразию происходило в связи с миграцией теплокровных животных и сопровождающих их кровососущих насекомых – переносчиков туляремии. В таком случае это должно было произойти до последнего исчезновения Берингова перешейка, имевшего место 10-11 тыс. лет назад. Именно с этого времени гидрография предполагаемого пути распространения *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* начинает напоминать современную – озера этого региона формируются в процессе усыхания и дробления на изолированные водоемы более крупных озер. Так, большая часть водоемов Котловины Больших Озер в Монголии образовалась 5-10 тыс. лет назад [14]. Наличие крупных водоемов могло облегчить расселение *F. tularensis*. Также именно в этот период проходило формирование современной флоры в данном регионе [26], то есть образовывались современные биоценозы. Наблюдаемое в настоящее время разделение водоемов аридными регионами могло изолировать популяции друг от друга, препятствуя свободному обмену штаммами, некоторые из популяций туляремийного микроба могли погибнуть.

Однако, подтверждение нашей гипотезы требует проведения работ по сбору полевого материала в Котловине Больших Озер в Монголии, окрестностях оз. Улюнгур в КНР, и Балхаш-Алакюльской низменности в Казахстане, и анализа подвидовой принадлежности изолятов *F. tularensis*, если они будут обнаружены.

2.3.3 Оптимизирование числа VNTR-локусов, сохраняющее разрешающую способность MLVA-типирования на уровне метода A. Johansson

Как видно из таблицы 17, информативность и значимость использованных для построения филогенетического дерева 25 локусов не одинакова. Этот факт был отмечен в литературе и ранее, позволяя предположить возможность уменьшения количества используемых для анализа VNTR-локусов [274]. Автором было показано, что анализ сохраняет достаточную разрешающую силу при использовании всего 11 VNTR локусов. Однако применение этого подхода к

исследуемой в данной работе выборке штаммов привело к нарушению кластеризации.

Мы провели собственный анализ по определению минимального числа локусов, которое позволило бы не снижать разрешающую способность, предложенного A. Johansson [274] MLVA-типирования по 25 локусам. Выбор локусов осуществляли по нескольким критериям, в частности, по размеру локуса и степени его вариабельности в рамках того или другого подвида. В результате исследований мы пришли к выводу, что для сохранения в полном объеме получаемых данных о внутриподвидовой кластеризации штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* необходим минимальный набор из 17VNTR-локусов: Ft-M2, Ft-M3, Ft-M4, Ft-M5, Ft-M6, Ft-M7, Ft-M8, Ft-M10, Ft-M12, Ft-M13, Ft-M17, Ft-M18, Ft-M20, Ft-M21, Ft-M22, Ft-M24, Ft-M25. Полученная дендрограмма приведена в приложении 2. При этом определяется такое же число индивидуальных генотипов (G=127) и сохраняется разделение штаммов по основным филогенетическим группам, хоть несколько изменяется состав более мелких групп и их филогенетические отношения. Так, при сохранении деления на подвиды и выделения внутри голарктического подвида в отдельные филогенетические группы штаммов японского биовара и группы Nevada, группы Южно-Сибирских штаммов, а также 4 Московских штаммов, наиболее близкими к Ханты-Мансийским штаммам оказываются не только штаммы I-365R, A-408(217) и 401, но и A-299(472) , выделенный в Казахстане, M-1354, выделенный в Астраханской области, и 1238, выделенный в Ростовской области. Но в рамках этого расширенного кластера Ханты-Мансийские штаммы все же образуют отдельную подгруппу.

При снижении количества VNTR-локусов до 16 количество индивидуальных генотипов уменьшалось минимум до 120. Дальнейшее снижение количества локусов приводило к резкому снижению информативности анализа и к смешиванию основных филогенетических групп, в первую очередь нарушалось распределение в отдельные кластеры японского биовара подвида *holarctica* и группы Nevada. Расхождение с данными A. J. Vogler [473], очевидно, связано с

наличием в нашей работе штаммов с аномальным MLVA-профилем, выбивающимся за пределы типичных для отдельных подвидов значений кратности тандемных повторов в отдельных локусах. И, хотя при этом по большей части можно определить подвидовую принадлежность исследуемого штамма, на наш взгляд, использование даже 6-8 VNTR-локусов (минимальный набор, позволяющий определять подвиды) для этой цели является нецелесообразным в связи с несоответствием затраченного времени и усилий с полученным результатом.

2.4 Обсуждение результатов

Одним из направлений при разработке научно-методических подходов в области обеспечения химической и биологической безопасности является создание средств специфической индикации и лабораторной диагностики особо опасных инфекций нового поколения. Общие клинические симптомы на начальном этапе развития легочных форм чумы, туляремии и сибирской язвы вызывают необходимость проводить дифференциальную диагностику, в минимальные сроки точно диагностировать возбудителя для применения эффективных методов лечения и предотвращения эпидемических вспышек. Именно с этой целью нами была разработана тест-система «MULTI-FLU», которая, как было показано, обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет сократить время анализа и количественно оценить содержание возбудителя в образцах. Одновременная амплификации нескольких ДНК-мишеней позволяет провести одномоментную индикацию нескольких возбудителей.

Проведенный поиск по патентным базам и научно-техническим источникам информации показал отсутствие сведений об отечественных наборах, предназначенных для выявления *Y. pestis, B. anthracis* и *F. tularensis* методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентным учетом результатов, обеспечивающих детекцию возбудителей в биологическом материале и объектах окружающей среды. Результаты проверки созданной нами тест-системы «MULTI-FLU», в основе которой лежит применение метода мультилокусной ПЦР «в реальном

времени», показали, что ею успешно выявляются три вида возбудителей особо опасных инфекций независимо от плазмидного профиля штаммов, а также дифференцирование их от близкородственных видов, а, в случае туляремийного микроба, от непатогенных подвидов. Это подтверждает, что выбор ДНК-мишеней, дизайн и синтез специфических праймеров и гибридизационных зондов для индикации штаммов *Y. pestis, B. anthracis* и *F. tularensis* оптимален для данного набора и выполняет поставленные задачи.

Для внутривидовой диагностики возбудителя туляремии нами предложено использование ПЦР с одним праймером, содержащим последовательность Chi1f сайта *E. coli* [6]. Уникальность распределения ампликонов, синтезируемых с помощью праймера Chi1f на матрицах хромосомных ДНК, характерна не только для бактерий *F. tularensis*, но и для других бактерий, таких, как *S. enteritidis, Y. pestis* EV линии НИИЭГ, *E. coli*. Сравнение подвижности доминирующих по интенсивности свечения ампликонов позволяет сделать предположение, что праймер Chi1f можно использовать не только для внутривидовой дифференциации *F. tularensis*, но и, в определенных рамках, для межвидового и родового типирования генетического материала. Картина распределения ампликонов ПЦР ДНК *F. tularensis* различных подвидов с использованием праймера Chi1f свидетельствует о существенном отличии подвида *novicida* от других подвидов. Уникальное сходство ампликонов размером ~975 п.о., полученных с использованием ДНК штаммов подвидов *mediasiatica* и *tularensis,* согласуется с подобием этих подвидов по ряду биохимических свойств (ферментация глицерина и продукция цитруллинуреидазы). На перспективность использования однопраймерного ПЦР указывает тот факт, что при анализе четырех культур *F. tularensis* (А-554, А-678, А-823, А-1045), выделенных в разных районах Алтайского края в летне-осенний период 2011 г., этим методом было обнаружено, что все они в ПЦР дают ампликоны с размерами ~279 и ~829 п.н., что подтверждает принадлежность исследуемых штаммов к виду *F. tularensis*. Наличие фрагмента размером ~558 п.о., характерного для голарктического подвида, у культуры А-1045 свидетельствует о ее принадлежности к подвиду

holarctica. Ампликон размером ~975 п.н., специфичный для бактерий подвидов *mediasiatica* и *tularensis,* присутствует у штаммов А-554, А-678, А-823, однако эти штаммы не дают в ПЦР ампликон размером~500 п.о., характерный для подвида *tularensis*, что позволяет отнести их к подвиду *mediasiatica*.

Эти штаммы были проанализированы по схеме, предложенной A. Johanson и соавторами [274]. Проведенные исследования подтвердили установленную методом однопраймерного типирования подвидовую принадлежность изучаемых штаммов туляремийного микроба: штамм А-1045 относится к голарктическому, а штаммы А-554, А-678 иА-823 – к среднеазиатскому подвиду [46].

Перечисленные выше методы генодиагностики («MULTI-FLU» однопраймерного типирования Chi1f), решают в основном вопросы лабораторной дифференциальной диагностики. Для эпидемиологического расследования важно точное определение штаммовой принадлежности, что позволяет установить источник инфекции и пути распространения. Для этих целей широко применяется анализ вариабельных нуклеотидных тандемных повторов [274]. Предложенная A. Johansson схема представляет собой мультилокусный анализ по 25-VNTR локусам. MLVA типирование позволяет определять генетическую гетерогенность подвидов *F. tularensis*. Этот метод, используемый для генотипирования возбудителя туляремии, требует оптимизации и совершенствования. Исследователи пытаются минимизировать количество исследуемых VNTR-маркеров, сохраняя максимальную разрешающую способность. Так, A. J. Vogler предложил систему с 11 VNTR-локусами, исследовав 189 штаммов из коллекции. A. Johansson было показано, что таким количеством VNTR-локусов можно точно установить подвидовую принадлежность штаммов, но для уточнения генотипа в некоторых случаях необходимо проведение SNP-типирования [272].

В настоящей работе мы проанализировали 159 штаммов, находящихся в Государственной коллекции «ГКПМ-Оболенск», используя метод MLVA типирования по 25 VNTR-локусам [274]. Нам удалось идентифицировать 127 индивидуальных генотипов, что свидетельствует о высокой разрешающей способности данного подхода. Для уменьшения трудоемкости метода были

определены 17 VNTR-локусов, по которым было проведено генотипирование штаммов *F. tularensis,* изолированных в основном на территории бывшего Советского Союза. Полученные результаты свидетельствуют, что выбранные нами 17 VNTR-локусов полностью сохраняют разрешающую способность метода с использованием 25 VNTR-локусов [274]. Таким образом, предложенная оптимизация схемы мультилокусного анализа позволяет проводить подвидовую идентификацию штаммов, определять внутриподвидовые особенности штаммов, связанные с их географическим происхождением, и выявлять тонкие генетические отличия штаммов внутри кластера.

Кроме задач молекулярной эпидемиологии, MLVA типированием решаются фундаментальные задачи медицинской микробиологии по изучению микроэволюции патогенов, в том числе и *F. tularensis*. При построении филогенетического дерева в рамках подвида *holarctica* был дифференцирован кластер из двух штаммов этого подвида – Japonski Downs и 0/284, и одного штамма – Nevada 14, ранее отнесенного к подвиду *tularensis.* MLVA-профили этих штаммов несли в себе черты как штаммов голарктического, так и неарктического подвидов. Выявленная особенность профилей этой филогенетической группы, названной нами Nevada, позволила предположить существование эволюционно древней ветви *F. tularensis*, представляющей переходную форму между подвидами *tularensis* и *holarctica*, либо филогенетически близкую их общему предку.

В пределах подвида *holarctica* была описана генетически обособленная популяция *F. tularensis* с делеций в локусах Ft-M5 и Ft-M12 и снижением кратности повторов в локусе Ft-M17 до 1, образовавшая отдельный кластер. В этот кластер входят штаммы двух достаточно далеко географически отстоящих друг от друга ареалов – Иркутского и Барнаульского. Такое филогенетическое родство географически отдаленных штаммов, на наш взгляд, говорит о “белых пятнах” на огромной территории Южной Сибири. Результаты наших исследований дают основания выделить отдельную южно-сибирскую популяцию возбудителя туляремии подвида *holarctica*, а продолжение работ по выделению и

генотипированию новых изолятов с территории Южной Сибири помогут расширить знания в области микроэволюции *F. tularensis*.

Впервые на территории России в Алтайском крае были выделены штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. До сих пор считалось, что этот подвид распространен только на территории Средней Азии, что и обусловило подвидовое название.

При изучении выделенных в Алтайском крае штаммов было обнаружено, что они как по фенотипическим признакам (сниженной лактамазной активности в отношении бензилпенициллина и нитроцефина), так и по результатам MLVA и однопраймерного типирования соответствуют среднеазиатскому подвиду. Это свидетельствует о наличии в Алтайском крае популяции *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, ареал распространения которой территориально перекрывается с западной частью ареала распространения сибирских штаммов голарктической расы туляремийного микроба.

Ранее считалось, что туляремийный микроб среднеазиатского подвида распространен только на территории Южного Казахстана. Обнаружение нами генетически обособленных изолятов этого подвида, а также впоследствии дополнительное выделение в этом регионе еще 9-ти изолятов (в данную работу не включены данные по 9 штаммам *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, переданных в нашу коллекцию из ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае» в 2012-2013 г.г.) свидетельствуют в пользу того, что данный подвид является эндемичным для Южной Сибири.

Полученные данные позволили нам выдвинуть гипотезу эволюционной модели появления и распространения среднеазиатского подвида. Учитывая генетическое родство подвидов *mediasiatica* и *tularensis*, можно предположить, что *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* возник от проникшего из Америки в Евразию *F. tularensis* subsp. *tularensis* (что могло произойти до последнего исчезновения Берингова перешейка 10-11 тысяч лет назад [274, 472]), который, мигрируя на запад, снизил вирулентность и потерял лактамазную активность, что позволило отнести его к подвиду *mediasiatica*. Алтайская популяция *F. tularensis* subsp.

mediasiatica в этом случае, вероятно, является эволюционно более древней, чем Среднеазиатская, так как находится значительно восточнее.

С учетом привязанности *F. tularensis* к водным биотопам можно предположить, что распространение *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* происходило вдоль цепи водоемов. Наиболее вероятно путь распространения *F. tularensis* связан с миграцией теплокровных животных и сопровождающих их кровососущих насекомых (переносчиков туляремии) вдоль этих водоемов. Озера этого региона формируются в процессе усыхания и дробления на изолированные водоемы более крупных озер. Вероятно, так образовалась большая часть водоемов Котловины Больших Озер в Монголии 5-10 тыс. лет назад [14]. В этот период проходило и формирование современной флоры в данном регионе [26], то есть образовывались современные биоценозы. Усыхание некоторых водоемов стало препятствовать свободному перемещению штаммов, некоторые из популяций туляремийного микроба могли исчезнуть.

Для подтверждения нашей гипотезы требуется проведение работ по выделению природных штаммов в Котловине Больших Озер в Монголии, окрестностях оз. Улюнгур в КНР, Балхаш-Алакюльской низменности в Казахстане и анализа подвидовой принадлежности изолятов *F. tularensis*, если они будут обнаружены.

Глава 3 НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ГЕНОВ *F. TULARENSIS*

Современные методы позволяют изучать с одной стороны молекулярно-генетические основы вирулентности (в том числе и основы биохимических свойств) туляремийного микроба, с другой стороны дают возможность целенаправленно снижать вирулентность и разрабатывать стратегию создания новых вакцинных штаммов, которые смогут обеспечить эффективный защитный иммунитет против туляремии [275].

При создании новых вакцинных штаммов главными требованиями являются улучшение свойств существующей вакцины, в том числе снижение реактогенности, сохранение протективных свойств и генетическая стабильность штамма, кроме того, геном, учитывая современные требования к живым вакцинам, должен нести генетические маркеры для его дифференциации от природных штаммов. Магистральный путь получения таких штаммов - направленный мутагенез целевых генов *F. tularensis*. Ранее был предложен метод аллельного обмена генов в хромосоме туляремийного микроба, основанный на межвидовой мобилизации рекомбинантных плазмид, созданных на базе плазмидного вектора pPV [233], а также метод, основанный на переносе с помощью трансформации рекомбинантных плазмид, содержащих модифицированный репликон плазмиды pFNL10 [331]. Нами сконструирован суицидный вектор pGM5 с использованием бирепликонной плазмиды pHV33 [186], который также может быть использован для аллельного обмена. Особенностью плазмиды pGM5 является ее способность трансформировать клетки *F. tularensis* и крайне медленно реплицироваться в туляремийном микробе.

Одним из диагностических признаков при определении подвидовой принадлежности являются биохимические различия *F. tularensis*. Нами были предприняты попытки изучения генетических основ биохимических различий для подвидовой дифференциации туляремийного микроба. Для этих целей использовался как суицидный вектор pGM5, так и его усовершенствованный вариант – плазмида pGM6.

3.1 Конструирование суицидного плазмидного вектора pGM5 для аллельного обмена генов в хромосоме *F. tularensis*

Изучение внехромосомных генетических элементов, начавшееся в начале 60-х годов прошлого века, позволило создать новые биологически безопасные технологии получения модифицированных штаммов микроорганизмов для практического использования [4, 32]. Схема конструирования векторных плазмид для сайт-направленного мутагенеза разработана для ряда микроорганизмов и имеет много общих черт. Во-первых, репликон не должен автономно реплицироваться в изучаемом микробе. Во-вторых, необходим селекционный маркер для отбора первичных рекомбинантов. Ген, кодирующий этот маркер, может находиться как внутри мутируемого гена, так и вне его на векторной плазмиде. В третьих, необходим дополнительный селекционный маркер для отбора клонов с делетированной из хромосомы плазмидой в результате повторной рекомбинации. Ген этого маркера должен находиться на векторной плазмиде вне мутируемого гена [68].

Векторная плазмида pGM5 сконструирована нами на основе плазмиды pHV33 [44] с введенным в нее геном *sacB* и делецией в *ori*-области pC194. Использование вектора pGM5 обеспечивает непосредственный перенос делетированных вариантов генов в клетки *F. tularensis* методом трансформации без дополнительных стадий с использованием *E. coli.*

Этапы получения векторной плазмиды pGM5

Конструирование суицидного вектора pGM5. Суицидный вектор был получен в результате поэтапной модификации плазмиды pHV33, состоящей из плазмид pBR322 и pC194 [186].

Получение плазмиды pHV33'mob. Для создания векторной плазмиды pGM5 использовали ДНК pHV33 [186], которую линеаризовали эндонуклеазой рестрикции BamHI и лигировали с Bam HI-фрагментом ДНК размером 1,7 т.п.н. с mob-областью плазмиды RP4, взятым из плазмиды pPV [233]. Полученным лигатом трансформировали клетки штамма *E. coli* JM83 методом электропорации и отбирали трансформанты на среде LA с хлорамфениколом (10 мг/мл). Из

микробных клеток выросших колоний выделяли плазмидную ДНК, которую обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Hind*III и рестрикты анализировали в 0,7 % агарозном геле. В результате отобрали два варианта клонов. Во всех образцах наблюдали наличие двух фрагментов ДНК: размером ~4,3 т.п.о. (pBR322) и ~2,9 т.п.о. (pC194) или ~2,7 т.п.о. (pC194, лишенная участка плазмиды, прилегающего к области начала репликации). Делеционный вариант плазмиды pHV33mob получил название pHV33′mob (рисунок 11). Возникший делеционный вариант плазмиды содержит гибридный ген *cat* под контролем промотора гена *repH*.

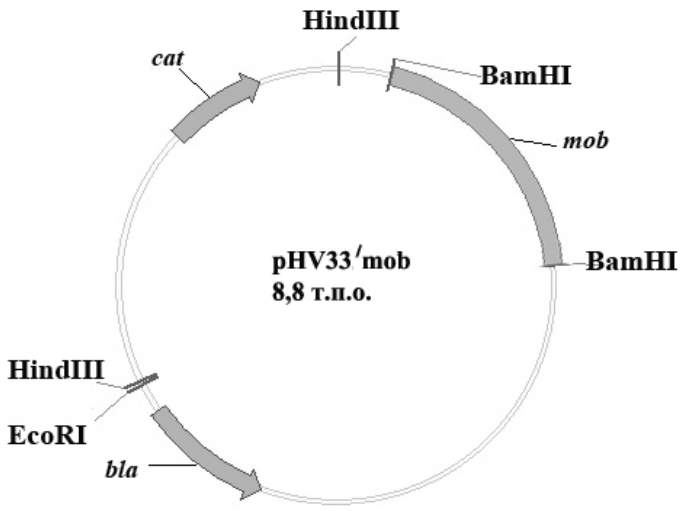


Рисунок 11 – Структурная карта плазмиды pHV33′mob

Получение плазмиды pHV33′mobsacB. Плазмидную ДНК pHV33′mob линеаризовали эндонуклеазой рестрикции *EcoR*I и «липкие» концы достраивали с помощью ДНК-полимеразы фага Т4. *Pst*I-фрагмент ДНК размером 2,4 т.п.о., взятый из плазмиды pPV [233] и содержащий ген *sacB* из генома *B. subtilis*, обрабатывали ДНК-полимеразой фага Т4 для достройки «липких» концов. Векторную часть и фрагмент смешивали и лигировали. Полученным лигатом трансформировали клетки *E. coli* DH5α методом электропорации и отбирали трансформанты на среде LA с хлорамфениколом (10 мг/мл). Отобранные клоны не росли на среде с 5 % сахарозой, что указывает на экспрессию гена *sacB* в клетках кишечной палочки. Плазмида со встроенным геном *sacB*, необходимым

для селекции бактерий, потерявших плазмиду, получила название pHV33′mobsacB (рисунок 12).

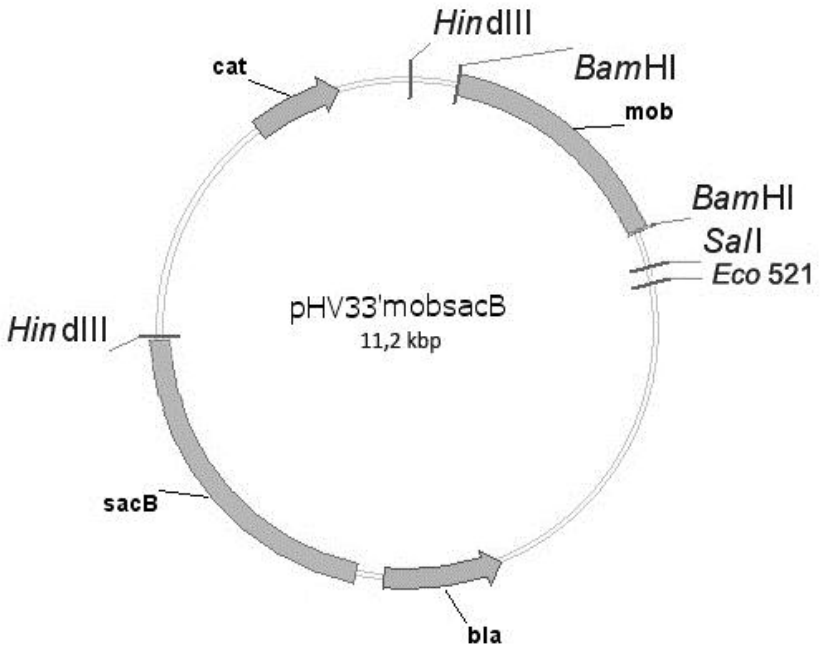


Рисунок 12 – Структурная карта плазмиды pHV33′mobSacB

Создание плазмидного вектора pGM5 для аллельного обмена в туляремийном микробе. Для удаления *BamH*I сайта в конструируемой плазмиде pHV33′mobsacB ДНК обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *BamH*I и лигировали с хромосомной ДНК из *E. coli* DH5α, расщепленной мелкощепящей рестриктазой *Sau*3A. Полученным лигатом трансформировали клетки штамма *E. coli* DH5α. Отбор колоний производили на среде LA в присутствии хлорамфеникола (10 мг/мл). Отобранные колонии проверяли на отсутствие mob-фрагмента и находили клоны, содержащие плазмиду pHV33′sacBΔB, лишенную области mob с инактивированным *BamH*I сайтом рестрикции. Из одного из клонов выделяли плазмидную ДНК, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Sal*I и *Eco*521 [*Xma*III] и лигировали с фрагментом ДНК, вырезанным по сайтам рестрикции *Sal*I и *Eco*521 [*Xma*III] из полилинкера плазмиды pBlueskript II SK(-). Полученная плазмидная конструкция получила название pGM5 (рисунок 13).

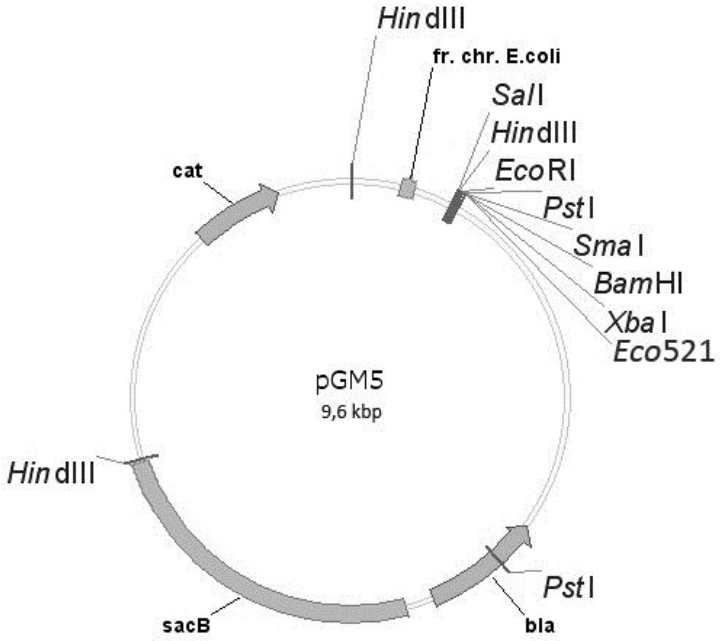


Рисунок 13 – Структурная карта плазмидного вектора pGM5

Эту плазмиду использовали для проведения сайт-направленного мутагенеза туляремийного микроба, в частности, для делеции генов *qseC, purMCDN, recA, recD iglC* (одной и двух копий) и *bla* в вакцинном штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

3.2 Конструирование суицидного плазмидного вектора pGM6

В процессе получения делеционных мутантов с помощью плазмиды pGM5 нами было обнаружено, что в отдельных случаях, например, при инактивации гена *bla2*, кодирующего функционально активную β-лактамазу, отобрать клон с целевой рекомбинацией не представлялось возможным.

Предположив, что нестабильность клонируемого фрагмента может являться следствием присутствия в последовательности плазмиды pGM5 участка ДНК *E.coli* с неизвестной последовательностью, мы провели работу по модификации данной плазмиды. Из нее был удален этот фрагмент ДНК *E.coli*, а также для удобства дальнейшей работы был изменен полилинкер.

Для этого плазмида pGM5 была обработана эндонуклеазами рестрикции *Nhe*I и *Eco*521, при этом из плазмиды вырезался фрагмент, содержащий как ДНК *E.coli*, так и полилинкер. После электрофоретического разделения продуктов реакции, выделения из агарозного геля линеаризованной плазмиды и очистки в

нее был лигирован фрагмент, содержащий сайты рестрикции *Nhe*I, *Xba*I, *Xho*I, *Sal*I, *Eco*521, полученный отжигом друг на друга олигонуклеотидов 5′-CTAGCTCTAGACTCGAGTCGAC-3′ и 5′-GGCCGTCGACTCGAGTCTAGAG-3′ (режим отжига: 95 °C – 120 с, 45 °C – 40 с, охлаждение до 40 °C). Молярное соотношение вектора и вставки при лигировании составляло 1:1. После трансформации лигазной смесью клеток *E.coli* DH5ά из клонов, способных к росту на ампициллине и хлрамфениколе, были выделены плазмиды, которые затем были подвергнуты рестрикционному анализу для уточнения присутствия всех перечисленных выше сайтов для эндонуклеаз рестрикции. Полученная плазмида получила название pGM6 (рисунок 14).

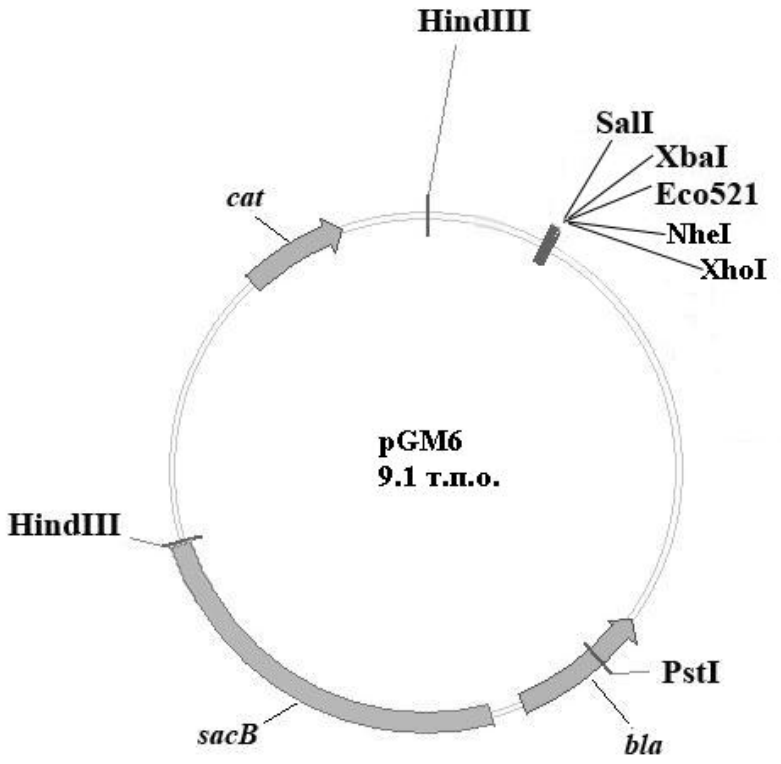


Рисунок 14 – Структурная карта плазмидного вектора pGM6

Разработанная нами методология аллельного обмена в хромосоме *F. tularensis* с помощью суицидных векторов pGM5 и pGM6 (рисунок 15) позволила получить штаммы с делетированными генами *qseC*, *purMCDN*, *recA*, *recD*, *iglC* и *bla* и изучить их влияние на свойства туляремийного микроба.

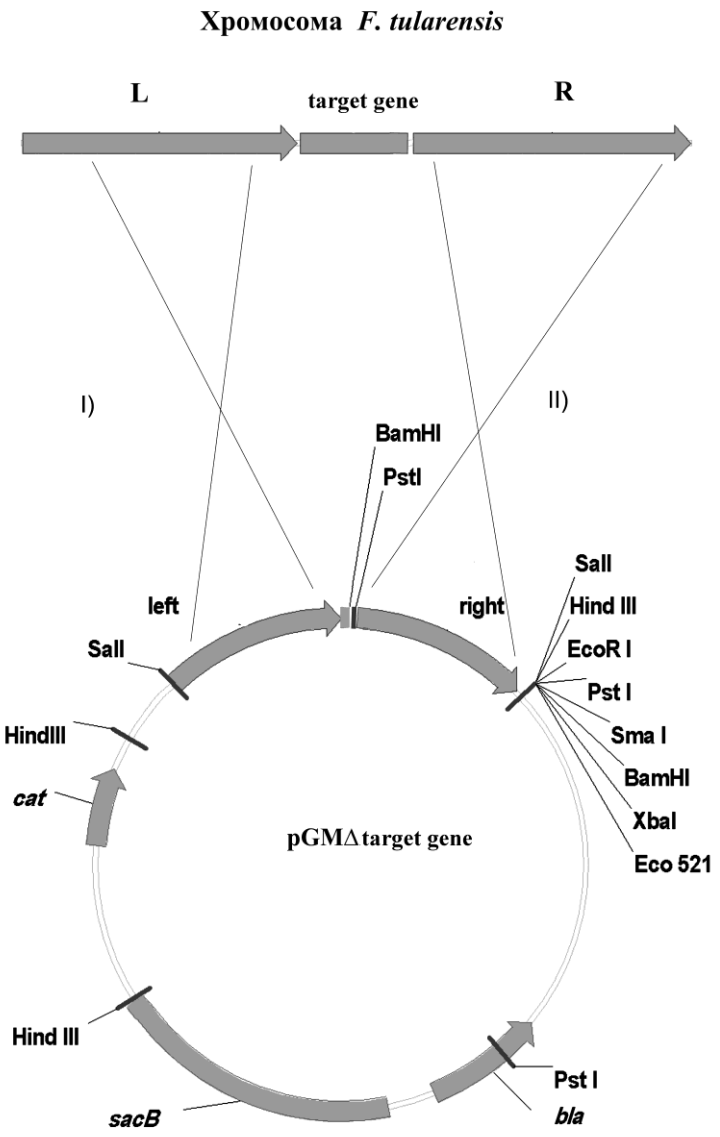


Рисунок 15 – Общая схема рекомбинации плазмиды pGMΔ*ген-мишень* и участка хромосомы геном-мишенью *F. tularensis.*

Примечание: I) – вариант встраивания плазмиды pGMΔ*ген-мишень* по левому плечу (left, L);
II) – вариант встраивания плазмиды pGMΔ*ген-мишень* по правому плечу(right, R)

3.3 Создание с помощью суицидных векторов pGM5 и pGM6 плазмид с инактивированными генами оперонов *igl, rec, qse pur* и *bla* и получение вариантов штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ с делецией перечисленных генов

3.3.1 Конструирование штамма с делецией гена *qseC* на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Различные системы «чувства кворума» (ЧК) или кооперативной чувствительности широко распространены среди грамотрицательных и грамположительных бактерий и играют важную роль в регуляции их патогенных

свойств [22,23]. Среди особо опасных патогенных бактерий системы ЧК обнаружены у возбудителей азиатской холеры *Vibrio cholerae* [494], мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* [468], сапа *Burkholderia mallei* [467] и чумы *Yersinia pestis* [378]. Наличие аутоиндукторов показано также у возбудителей бруцеллеза *Brucella melitensis* [447] и сибирской язвы *Bacillus anthracis* [276].

Несмотря на то, что возбудитель туляремии *F. tularensis* является одной из наиболее высоковирулентных грамотрицательных бактерий и относится к особо опасным патогенам категории А − потенциальным агентам биотерроризма, система ЧК у этого микрооганизма остается малоизученной [349].

Ген *qseC*, относящийся к системе ЧК, ответственен за продукцию сенсорной гистидин-киназы. Создание на основе вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ штамма с инактивированным геном *qseC* позволило изучить роль систем кооперативной чувствительности *F. tularensis* в патогенезе туляремийной инфекции [45].

При проведении анализа *in silico* методом BLAST в базах данных Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, NCBI, США) были получены данные сравнительного анализа последовательности генов чувства кворума у 13 штаммов вида *Francisella tularensis* различного географического происхождения, что позволило провести дизайн праймеров для мутагенеза генов ЧК *F. tularensis,* в частности, гена *qseC.*

Области генома размером 1513 п.о. (5' левое плечо) и размером 1546 п.о. (3' правое плечо) гена *qseC*, включая первые 102 нуклеотида и последние 130 нуклеотидов, соответственно (таблица 18), амплифицировали в ПЦР с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК из штамма *F. tularensis* 15. Для получения фрагментов хромосомной ДНК с делецией гена *qseC* были сконструированы праймеры для левого плеча, FtqseCL15 и FtqseCR0, содержащие рестрикционные сайты *Sal*I и *Bgl*II, соответственно, и праймеры для правого плеча, FtqseCL0 и FtqseCR15, содержащие рестрикционные сайты *Bgl*II и *Xba*I, соответственно (таблица 18.), комплементарные участкам ДНК, фланкирующим ген *qseC* в хромосоме туляремийного микроба.

Таблица 18 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации 5'- и 3'-фланкирующих областей гена *qseC*

Ампли-фици-руемый ген	Локали-зация (п.о.) *[а]	Размер праймера (п.о.)	Размер про-дукта (п.о.)	Праймер	Последовательность (от 5' к 3') и сайт рестрикции[б]
Левое плечо					
qseC	1694424–1694452	29	1513	FtqseCL15	TAAGTCGACACTAAATGTGTATATTCAGG SalI
qseC	1695932–1695900	33		FtqseCR0	CCGAGATCTAACTAACTAAAAATTGATATAACC BglII
Правое плечо					
qseC	1697110–1697135	26	1546	FtqseCL0	GTAAGATCTAGGTTTAGCAATCGTCG BglII
qseC	1698655–1698627	29		FtqseCR15	TTATCTAGACAATGAGCCAAGTACAGGAC XbaI

Примечание: [а] Относится к геному *F. tularensis* ssp. *holarctica* (Gen Bank NCBI, NC_007880); [б] Подчеркнуты сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции и указаны эндонуклеазы рестрикции;* п.о. – пар оснований

Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазами *Sal*I и *Bgl*II (левое плечо *qseC*), *Xba*I и *Bgl*II (правое плечо *qseC*), объединяли, смешивали с плазмидной ДНК pGM5, рестрицированной по сайтам *Xba*I и *Sal*I, и лигировали. Полученным лигатом трансформировали клетки штамма *E. coli* DH5α. Отбор трансформантов проводили по фенотипу Ap^RCm^R. Полученные клоны проверяли в ПЦР на наличие в векторной плазмиде pGM5 вставки делетированного варианта гена *qseC*.

Полученный штамм *E. coli* DH5α*ΔqseC* содержал плазмиду pGM5*ΔqseC* с делетированным на 1185 п.о. геном *qseC*, фланкированным гомологичными последовательностями протяженностью ~1400 п.о. с каждой стороны. Выделенную из штамма *E. coli* DH5α*ΔqseC* рекомбинантную ДНК использовали для трансформации штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом электропорации [389] с целью аллельного замещения интактного гена *qseC* на мутантный вариант.

Правильность соответствующей делеции в заданном гене ЧК проверялась в полимеразной цепной реакции с праймерами, комплементарными последовательностям ДНК вне целевого гена (или с праймерами Ft*qseC*L15 и

Ft*qseC*R15), используя в качестве матрицы ДНК клеток мутантных клонов и исходных штаммов, которые, в случае нативного гена *qseC* в исследуемом клоне, выявляли ампликон размером 4232 п.о., а в случае делетированного гена *qseC* – ампликон размером 3047 п.о. Отобранные клоны штамма с делетированным геном *qseC* были обозначены как *F. tularensis* 15Δ*qseC* (рисунок 16.)

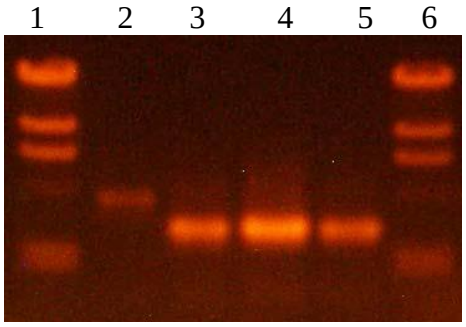


Рисунок 16 – Электрофореграмма ампликонов хромосомной ДНК *F. tularensis*, полученых в ПЦР с праймерами Ft*qseC*L15 и Ft*qseC*R15

Примечание: (дорожки 2-5). 2 – *F tularensis* 15 (дикий тип); 3-5 – клоны *F. tularensis* 15Δ*qseC*; 1,6 – ДНК фага λ-HindIII.

Для проведения комплементации штамма *F. tularensis* 15Δ*qseC* нативный ген *qseC*, фланкированный гомологичными последовательностями (общей длиной 2891 п.о.) клонировали в *E. coli* в составе плазмиды pPV, а также в составе плазмиды pHV33, однако ни одного клона, содержащего плазмиду с искомой вставкой, получить не удалось**.**

При введении структурной части гена *qseC* (от SD последовательности до терминирующего кодона включительно) под tet-промотором в плазмиды pHV33 и pHVT [64] нам удалось получить клоны *F. tularensis* 15Δ*qseC*/pHV33-*qseC* (рисунок 17А) и *F. tularensis* 15Δ*qseC*/pHVT-*qseC* (рисунок 17 Б).

Несмотря на то, что данные ПЦР подтверждают клонирование интактного гена *qseC* в штамм с делетированным геном, изучение биологических свойств не подтвердило восстановление таких свойств, как устойчивость к бактерицидному действию нормальной кроличьей сыворотки, способность выживать в мышиных макрофагах и остаточную вирулентность, присущих родительскому штамму *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Рисунок 17 − Электрофореграмма ампликонов лизатов *F. tularensis* 15(Δ*qseC*), полученных в ПЦР с праймерами Ft*qseC*L15 и Ft*qseC*R15

Примечание: **А** 1- *F. tularensis* 15ΔqseC/pHV33-*qseC*; 2 – *F. tularensis* 15Δ*qseC*; 3- *F. tularensis* 15; 4 - контроль (H_2O в качестве матрицы); 5 – маркер молекулярных масс Gene Ruler^{TM} 100 bp DNA Ladder Plus(Fermentas). **Б** 1 - ДНК фага λ-HindIII; 2– *F. tularensis* 15Δ*qseC*/pHVT; 3 - *F. tularensis* 15Δ*qseC*/pHVT-*qseC*.

3.3.2 Конструирование штамма с делецией генов *purMCDN* на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Анализ данных о нуклеотидных последовательностях ряда штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis* и *F. tularensis* subsp. *holarctica* свидетельствует, что этот микроорганизм содержит полный набор генов, необходимый для синтеза пуринов [381, 382]. Для создания штаммов *F. tularensis*, отличающихся от исходных делецией генов *purMCDN* в геноме туляремийного микроба. Гены оперона *purMCDN* кодируют ферменты, участвующие в многоэтапном синтезе пуринов. Ген *purM*, предположительно, кодирует фермент, синтезирующий 5’-фосфорибозил-*N*-формилглицинамидин (FGAM), а ген *purCD* кодирует бифункциональный фермент, синтезирующий 5’-фосфорибозил-5-аминоимидазол карбоксильную кислоту (CAIR) и 5’-фосфорибозиламин (PRA). Ген *purN* кодирует фермент, синтезирующий 5’- фосфорибозил -1- глицинамид (GAR) [382].

Для получения фрагментов хромосомной ДНК с делецией генов *purMCDN* были сконструированы праймеры для левого плеча, FtpurL15 и FtpurR0, содержащие рестрикционные сайты *Sal*I и *BamH*I, соответственно, и праймеры

для правого плеча, FtpurL0 и FtpurR15, содержащие рестрикционные сайты *Bgl*II и *Xba*I, соответственно (таблица 19), комплементарные участкам ДНК, фланкирующим гены *purMCDN* в хромосоме туляремийного микроба.

Таблица 19 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации 5'- и 3'-фланкирующих областей генов *purMCDN*

Ампли-фици-руемый ген	Локали-зация (п.о.)[а]	Размер прай-мера (п.о.)*	Размер про-дукта (п.о.)	Праймер	Последовательность (от 5' к 3') и сайт рестрикции[б]
Левое плечо					
purMCDN	363030-363043	23	1610	FtpurL15	AAAGTCGACAAGGTGTCGGCATA SalI
purMCDN	364522-364536	24		FtpurR0	AAAGGATCCTATACTTCTAAAACC BamHI
Правое плечо					
purMCDN	368302-368316	24	1588	FtpurL0	AACAGATCTTAAATATTCATCCAT BglII
purMCDN	369855-369871	26		FtpurR15	AGAGTCGACTAGAATTTTAGCGATTT *Xba*I

Примечание: [а] Относится к геному *F. tularensis* ssp. *holarctica* (Gen Bank NCBI, NC_007880); [б] Подчеркнуты сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции и указаны эндонуклеазы рестрикции;* п.о. – пар оснований

Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазами *Sal*I и *Bam*HI (левое плечо *purMCDN*), *Xba*I и *Bgl*II (правое плечо *purMCDN*), объединяли, смешивали с плазмидной ДНК pGM5, рестрицированной по сайтам *Xba*I и *Sal*I, и лигировали. Этой лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* DH5α. Отбор трансформантов проводили по фенотипу $Ap^R Cm^R$. Полученные клоны проверяли в ПЦР на наличие в векторной плазмиде pGM5 вставки делетированного варианта генов *purMCDN*.

Полученный штамм *E. coli* DH5α*ΔpurMCDN* содержал плазмиду pGM5*ΔpurMCDN* с делетированным на 3765 п.о. фрагментом ДНК, содержащим гены *purMCDN*, фланкированным гомологичными последовательностями протяженностью ~1500 п.о. с каждой стороны. Выделенную из штамма *E. coli* DH5α*ΔpurMCDN* рекомбинантную ДНК использовали для трансформации штамма *F. tularensis* 15 методом электропорации [389] с целью аллельного замещения интактных генов *purMCDN* на мутантный вариант.

Правильность соответствующей делеции в заданном гене *purMCDN* проверялась в ПЦР с праймерами, комплементарными последовательностям ДНК вне целевого гена, используя в качестве матрицы ДНК клеток мутантных клонов и исходных штаммов, которые, в случае нативного гена *purMCDN* в исследуемом клоне, выявляли ампликон большего размера, по сравнению с мутантным штаммом (рисунок 18.).

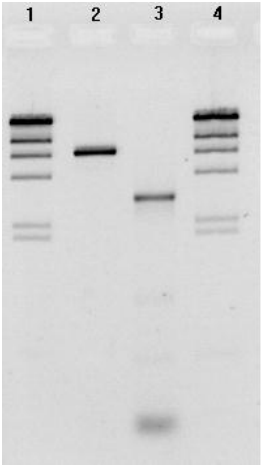


Рисунок 18 – Электрофореграмма ампликонов хромосомной ДНК *F. tularensis,* полученых в ПЦР с праймерами FtpurL15 и FtpurR15;
Примечание: 2 - ДНК *F. tularensis* 15; 3 - *F. tularensis* 15Δ*purMCDN*; 1,4 – ДНК фага λ-HindIII

3.3.3 Конструирование штамма с делецией гена *iglC* (одной и двух копий) на основе штамма 15 НИИЭГ *F. tularensis*

Одним из ключевых генов ТОП – туляремийного острова патогенности (FPI – Francisella Pathogenicity Island) является ген *iglC* размером 34 т. п. о. Кроме гена *iglC,* в этом регионе расположен еще ряд генов, продукты которых необходимы для выживания туляремийного микроба в макрофагах и в амёбах *Acanthamoeba castellanii* [358].

Разработанный нами метод сайт-направленного мутагенеза *F. tularensis* позволил показать, что в геноме штамма LVS содержатся две копии гена *iglC* [233], что впоследствии было подтверждено прямым секвенированием полного генома штамма *F. tularensis* LVS [404]. Анализ нуклеотидных последовательностей геномов штаммов *F. tularensis* Schu и LVS показал, что в них присутствуют не только две копии гена *iglC*, но и две копии ТОП. Влияние гена *iglC* на свойства штамма LVS было изучено ранее [233]. Мы использовали

плазмиду pGM5 для создания на основе вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ штаммов, отличающихся от вакцинного штамма инактивацией одной и двух копий гена *iglC*

Области генома выше и ниже гена *iglC* размером 1476 п.о. (5'-левое плечо) и размером 1557 п.о. (3'-правое плечо), включая первые 78 нуклеотидов и последние 8 нуклеотидов гена *iglC*, соответственно, амплифицировали в ПЦР с использованием в качестве матрицы хромосомной ДНК из штамма *F. tularensis* 15. Праймеры для левого плеча, FtiglCL15 и FtiglCR0, содержат рестрикционные сайты *Sal*I и *Bam*HI, соответственно. Праймеры для правого плеча, FtiglCL0 и FtiglCR15, содержат рестрикционные сайты *Bam*HI и *Sal*I, соответственно (таблица 20).

Таблица 20 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации 5'- и 3'-фланкирующих областей гена *iglC*

Ампли-фици-руемый ген	Локали-зация (п.о.)[а]	Размер праймера (п.о.)*	Размер про-дукта (п.о.)	Праймер	Последовательность (от 5' к 3') и сайт рестрикции[б]
Левое плечо					
iglC	103558-103575	28	1476	FtiglCL15	ACGC<u>GTCGAC</u>TACAATGCTAGAAACCTT SalI
iglC	105019-105034	25		FtiglCR0	TCG<u>GGATCC</u>TATACATGCAGTAGGA BamHI
Правое плечо					
iglC	105579-105596	27	1557	FtiglCL0	AAA<u>GGATCC</u>CTGCATAGTAAGATCGGA BamHI
iglC	107118-107136	29		FtiglCR15	GCGT<u>GTCGAC</u>TTAGCCGTGCCAATTACCA SalI

Примечание: [а] Относится к геному *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS (Gen Bank NCBI, NC_007880.1);[б] Подчеркнуты сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции и указаны эндонуклеазы рестрикции;* п.о. – пар оснований (нуклеотидов).

Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазами *Sal*I и *Bam*HI, объединяли, смешивали с плазмидной ДНК pGM5, рестрицированной по сайту узнавания *Sal*I и дефосфорилированной, и лигировали. Этой лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* DH5α. Отбор трансформантов проводили по фенотипу Ap^RCm^R. Полученные клоны проверяли в ПЦР на наличие в векторной плазмиде pGM5 вставки делетированного варианта гена *iglC*. Полученный штамм *E. coli* DH5α*Δiglc* содержал плазмиду pGM5*Δiglc* с

делетированным на 545 п.о. геном *iglC*, фланкированным гомологичными последовательностями протяженностью ~1,5 т.п.о. с каждой стороны. Выделенную из этого штамма рекомбинантную ДНК использовали для трансформации штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом электропорации [389] с целью аллельного замещения интактных генов *iglC* на мутантный вариант.

Для инактивации второй копии гена *iglC* выделенную из штамма *E. coli* DH5α*ΔiglC,* содержащего плазмиду pGM5*ΔiglC,* рекомбинантную плазмидную ДНК использовали для трансформации штамма *F. tularensis* 15/23-1 методом электропорации [389].

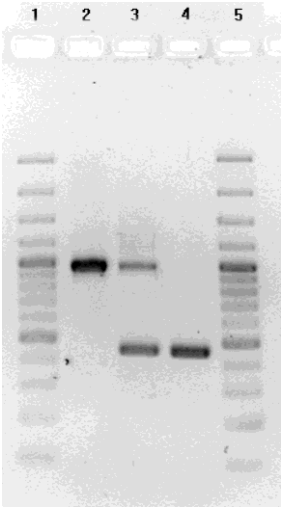


Рисунок 19 – Электрофореграмма ампликонов, полученных с праймерами 23CF и 23CR и ДНК штаммов

Примечание: 1,5 – Маркер GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва), *F. tularensis*: 2 - *F. tularensis* 15; 3 - *F. tularensis* 15/23-1; 4 - *F. tularensis* 15/23-2.

Для верификации аллельного обмена при проведении ПЦР использовали проверочные праймеры: 23CF - 5'-AAGGATAAGACCTGTCTG-3' и 23CR - 5'-TTGAAACCATACCGGGTA-3', которые, в случае делеции в одной копии гена *iglC,* выявляли два ампликона размерами ~990 и ~450 п.о. Отобранный вариант штамма с инактивированной одной копией гена *iglC* был обозначен, как *F. tularensis* 15/23-1; вариант с инактивированными двумя копиями гена *iglC* был обозначен, как *F. tularensis* 15/23-2 (рисунок 19).

Для комплементации гена *iglC* в мутантном штамме *F. tularensis* была создана плазмида pHV33′iglC, состоящая из вектора pHV33′ (делеционное производное плазмиды pHV33) и ампликона, содержащего фланкированный ~1,5

т.п.о. участками хромосомной ДНК *F. tularensis* нативный ген *iglC* (629 п.о.). Ампликон размером 3558 п.о. был получен с помощью праймеров 23SalL15 и 23SalR15 на матрице штамма *F. tularensis* 15. Ампликон был встроен в *Sal*I сайт плазмиды pHV33′. Особенностью плазмиды pHV33′ является то, что ее можно вводить в клетки туляремийного микроба методами криотрансформации или электропорации, но она крайне нестабильна в этих клетках, вероятно, из-за низкой скорости репликации. Частота интеграции плазмиды pHV33′iglC в хромосому штамма *F. tularensis* 15/23-2 при электропорации составляла $4 \cdot 10^{-4}$ (4 клона на 10^4 трансформантов).

Препарат ДНК pHV33′iglC, выделенный из клеток *E. coli*, переносили методом электропорации [389] в клетки *F. tularensis* с целью аллельного замещения одного из делетированных генов *iglC* на интактный вариант. Клоны с интегрированной плазмидой отличались от клонов с автономной плазмидой размером колоний и способностью к пересеву: единичные крупные колонии среди микроколоний, хорошо растущие при пересеве на среду с хлорамфениколом. Клоны с фенотипом Cm^R были проверены в ПЦР с использованием клонирующих праймеров FtiglCL15 и FtiglCR15. Комплементированные клоны давали синтез двух ампликонов размером 3,0 и 3,6 т.п.о., что соответствует наличию в геноме как делетированного, так и интактного вариантов гена *iglC*. Один из отобранных клонов был обозначен, как штамм *F. tularensis* 15/23-2ком.

3.3.4 Конструирование штаммов с делецией генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Анализ данных о нуклеотидных последовательностях показал, что в геноме *F. tularensis* присутствует ген *recA*, являющийся ключевым белком системы рекомбинации, и гены *recBCD*, кодирующие субъединицы экзодезоксирибонуклеазы V.

Перед геном *recA* в штамме LVS *F. tularensis* расположены гены *FTL_0010* (тиосульфат сульфурилтрансфераза), *FTL_0011* (препротеин транслоказа субъединица *SecB*), а за геном *recA* находятся гены *FTL_0013* (регуляторный белок *recX*) и *FTL_0014* (белок SSB)(рисунок 20). Расстояние между генами *recA*

и *FTL_0011* составляет 21 п.о., а ген *FTL_0010* отделен от гена *FTL_0011* межгенным участком размером 26 п.о. Ген *recA* имеет область перекрытия с геном *recX* в районе терминатора размером 15 п.о. Наличие этих фактов позволяет предположить, что все перечисленные гены составляют единый оперон. В подтверждение этому свидетельствует наличие региона ДНК размером 135 п.о., отделяющего гены *FTL_0010*, *FTL_0011* и *recA*, *FTL_0013* от гена *FTL_0009* (кодирующий поверхностный мембранный протеин); в данном регионе может располагаться промоторная область. Ген *ssb* отделен от гена *recX* нуклеотидной последовательностью размером 171 п.о. (рисунок 20.).

Рисунок 20 – Расположение гена *recA* в геноме *F. tularensis* subsp *holarctica* LVS.

Ген *recC* от генов *recB* и *recD* отделен двумя генами *FTL_0667* (гипотетический протеин) и *FTL_0668* (АТФ-зависимая ДНК-хеликаза), и имеет область перекрытия в районе его терминатора с геном *recC* размером 17 п.о. Перед геном *recC* находится межгенный участок хромосомной ДНК размером 76 п.о., в котором может располагаться промотор. Возможно, что гены *recC*, *FTL_0667* и *FTL_0668* образуют единый оперон.

Ген *recB* имеет область прекрытия с геном *recD* размером 9 п.о. в районе терминатора. Гены *recB* и *recD* отделены межгенным регионом размером 71 п.о. от генов *recC*, *FTL_0667* и *FTL_0668*. На основе этих фактов можно предположить, что гены *recB* и *recD* находятся в едином опероне (рисунок 21.).

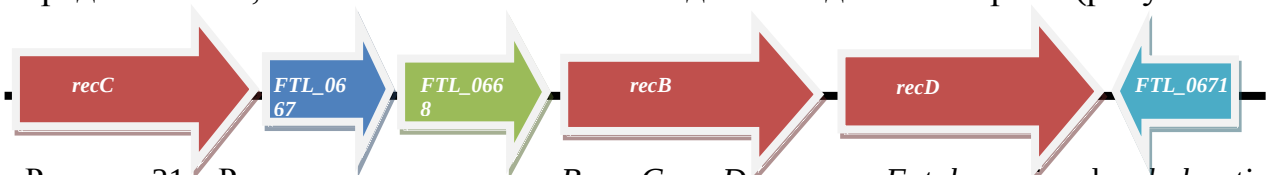


Рисунок 21 – Расположение генов *recB*, *recC*, *recD* в геноме *F. tularensis* subsp *holarctica* LVS.

Для получения фрагментов хромосомной ДНК с делециями генов *recA* и *recD* были сконструированы две пары праймеров FtrecAL15, FtrecAL0 и FtrecAR0, FtrecAR15 для гена *recA*, и две пары праймеров FtrecDL15, FtrecDL0 и FtrecDR0, FtrecDR15 для гена *recD* (таблица 21), комплементарные участкам ДНК, фланкирующих гены *recA* и *recD* в хромосоме туляремийного микроба. Праймеры

для левого плеча, FtrecAL15 и FtrecAL15 (гена *recA*), и FtrecDL15 и FtrecDL15 (гена *recD*) содержат рестрикционные сайты *Sal*I и *Bam*HI, соответственно. Праймеры для правого плеча, FtrecAR0 и FtrecAR15 (гена *recA*), и FtrecDR0 и FtrecDR15 (гена *recD*) содержат рестрикционные сайты *Bam*HI и *Sal*I, соответственно.

Таблица 21 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации 5'- и 3'-фланкирующих областей генов *recA* и *recD*

Ампли-фици-руемый ген	Локали-зация (п.о.)[а]	Размер прай-мера (п.о.)*	Размер про-дукта (п.о.)	Праймер	Последовательность (от 5' к 3') и сайт рестрикции[б]
Левое плечо					
recA	8225-8241	26	1592	FtrecAL15	AAAGTCGACCTGGTGGTTTGATGGTT SalI
recA	9800-9816	31		FtrecAR0	AAAGGATCCTTAAACTGATTCTAGCGCCTTT BamHI
Правое плечо					
recA	10841-10859	30	1392	FtrecAL0	AAAGGATCCTAAGCAGTTACTCAAGATGAG BamHI
recA	12216-12233	27		FtrecAR15	AAAGTCGACTACCATTCTCAAGGTACT SalI
Левое плечо					
recD	655985-656002	27	1454	FtrecDL15	AAAGTCGACTGGCAAAGATGATAGTGT SalI
recD	657401-657420	29		FtrecDR0	AAAGGATCCTTACATAGACGGAGTAGTCT BamHI
Правое плечо					
recD	658019-658037	29	1482	FtrecDL0	AAAGGATCCTAAGCTCAGAGAATGACAGA BamHI
recD	659467-659482	25		FtrecDR15	AAAGTCGACGTGCTATCCTACCAGG SalI

Примечание: [а] Относится к геному *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS (Gen Bank NCBI, NC_007880.1);[б] Подчеркнуты сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции и указаны эндонуклеазы рестрикции;* п.о. – пар оснований (нуклеотидов).

Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазами *Sal*I и *Bam*HI, объединяли, смешивали с плазмидной ДНК pGM5, рестрицированной по сайту узнавания *Sal*I и дефосфорилированной, и лигировали. Этой лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* DH5α. Отбор трансформантов

проводили по фенотипу Ap^RCm^R. Полученные клоны проверяли в ПЦР на наличие в векторной плазмиде pGM5 вставки делетированного варианта гена *recA* или гена *recD*. Полученные штаммы *E. coli* DH5α*ΔrecA* и *E. coli* DH5αΔrecD содержали плазмиды pGM5Δ*recA* с делетированным на 1060 п.о. геном *recA* и pGM5*ΔrecD* с делетированным на 603 п.о. геном *recD*, фланкированным гомологичными последовательностями протяженностью ~1,6 т.п.о. и ~1,4 т.п.о., соответственно. Выделенные из штаммов *E. coli* DH5α(Δ*recA*) и *E. coli* DH5α(Δ*recD*) рекомбинантные ДНК использовали для трансформации штамма *F. tularensis* 15 методом электропорации [389] с целью аллельного замещения интактных генов *recA* или гена *recD* на мутантный вариант.

Таким образом, нами были сконструированы плазмиды для аллельного обмена pGM5Δ*recA* и pGM5Δ*recD*, которые позволили получить штаммы *F. tularensis* 15Δ*recA* и 15Δ*recD* с делецией генов *recA* и *recD*. Наличие делеций указанных генов в геноме штамма *F. tularensis* 15НИИЭГ было подтверждено методом ПЦР с соответствующими праймерами (рисунок 22). Эти плазмиды можно использовать для инактивации генов *recA* и *recD* в других штаммах *F. tularensis*.

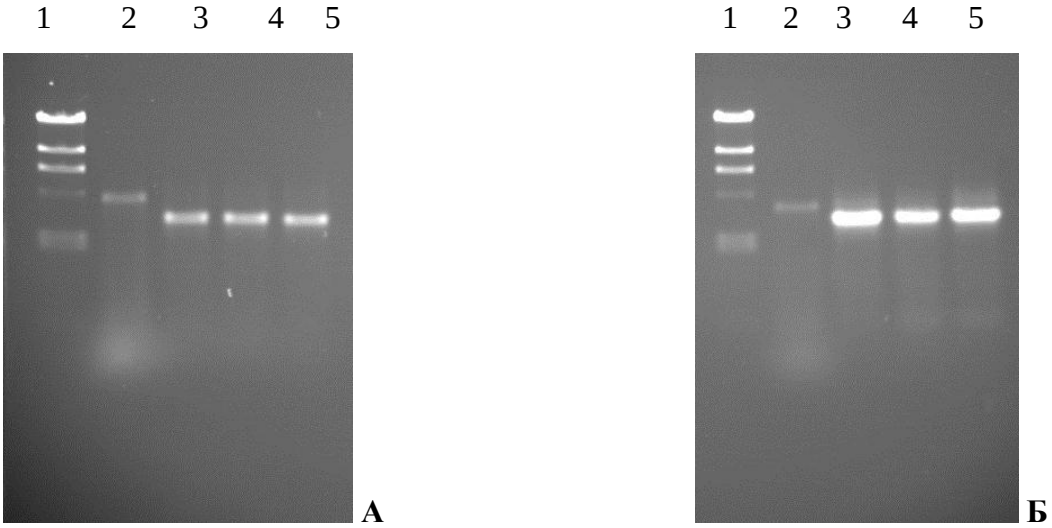


Рисунок 22 – ПЦР-анализ полученных клонов штаммов *F. tularensis*
А – 15Δ*recA*; **Б** – 15Δ*recD*

Примечание: 1 – маркер λHind (23130, 9416, 6557, 4316, 2322, 2027, 564, 125 т.п.о.); 2 –- исходный вариант *F. tularensis* 15/10 с нативной копией гена (**А**) *recA* (4009 п.о) и гена (**Б**) *recD* (3498 п.о); 3, 4, 5 –делетированный вариант *F. tularensis* 15Δ*recA* (2949 п.о) (**А**) и делетированный вариант *F. tularensis* 15Δ*recD* (2895 п.о) (**Б**).

По данным компьютерного анализа инактивация генов системы рекомбинации *recA* и *recD* у вакцинного туляремийного штамма не привела к сдвигу открытых рамок считывания: для гена *recA*, гена *recX* и гена *ssb*, находящихся в одном с ним опероне (рисунок 23), а для гена *recD* гена *recB* находящегося в одном опероне с геном *recD* (рисунок 24).

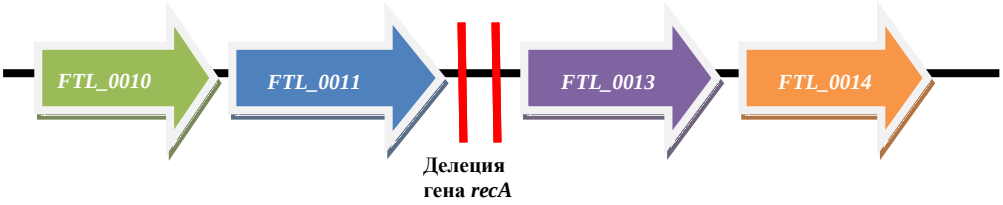


Рисунок 23 – Локализация делеции гена *recA*

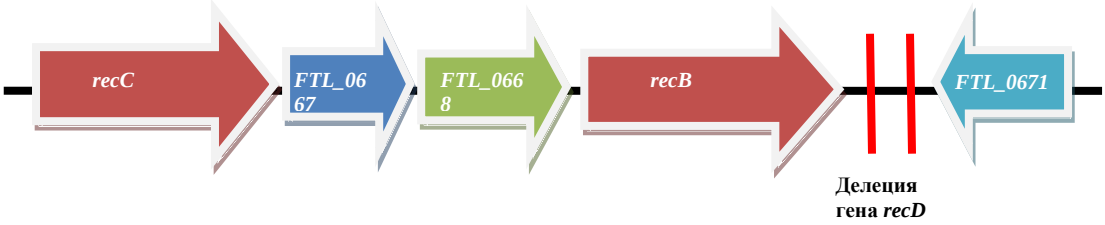


Рисунок 24 – Локализация делеции гена *recD*

Для комплементации генов *recA* и *recD* в штаммах *F. tularensis* 15Δ*recA* и *F. tularensis* 15Δ*recD* мы использовали гены *recA* и *recD*, встроенные в плазмиду pHV33-mob, реплицирующуюся как в клетках *E. coli*, так и в клетках *F. tularensis*.

Для получения рекомбинантной плазмиды pHV33-mob/*recA*, содержащей функционально активный ген *recA*, методом ПЦР был синтезирован ампликон размером 4009 п.о. с копией гена *recA* *F. tularensis* 15 с использованием праймеров FtrecAL15 и FtrecAR15 (таблица 21). Полученный ампликон обрабатывали рестриктазой *Sal*I и встраивали в *Sal*I сайт плазмиды pHV33-mob. Далее методом трансформации плазмиду pHV33-mob/*recA* переносили в клетки *E. coli* DH5α. Селекцию трансформантов *E. coli* DH5α, содержащих плазмиду pHV33-mob/*recA*, проводили на питательной среде с 100 мкг/мл Ap и 40 мкг/мл Tc. Один из клонов *E. coli* DH5α, не выросший на питательной среде с 40 мкг/мл Tc, но устойчивый к 100 мкг/мл Ap, был использован для выделения плазмидной ДНК. Наличие гена *recA* в плазмиде pHV33-mob/*recA* проверяли методом ПЦР и

рестрикцией по *Sal*I сайту (рисунок 26). Далее плазмиду pHV33-mob/*recA* переносили в клетки штамма *E. coli* S17-1 методом «кальциевой» трансформации. Из отобранных Ap^R Tc^S трансформантов клеток штамма *E. coli* S17-1 с плазмидой pHV33-mob/*recA* и проверенных в ПЦР с праймерами FtrecAL15 и FtrecAR15 был выбран один трансформант, который использовали в качестве донора при скрещивании с клетками штамма *F. tularensis* 15Δ*recA*. Селекцию конъюгантов *F. tularensis* 15ΔrecA с плазмидой pHV33-mob/*recA* проводили на FT-агаре, содержащем 3 мкг $мл^{-1}$ Cm. Один из выросших на FT-агаре с 3 мкг $мл^{-1}$ Cm клонов *F. tularensis* 15Δ*recA*(pHV33-mob/*recA*) использовали для изучения функциональной активности гена *recA*.

Для получения рекомбинантной плазмиды pHV33-mob/*recD* с функционально активным геном *recD* использовали ампликон размером 3498 п.о. с копией гена *recD F. tularensis* 15, полученный методом ПЦР с праймерами FtrecDL15 и FtrecDR15 (таблица 21). Полученный ампликон обрабатывали рестриктазой *Sal*I и встраивали в *Sal*I сайт плазмиды pHV33-mob. Далее методом трансформации плазмиду pHV33-mob/*recD* переносили в клетки *E. coli* DH5α. Селекцию трансформантов *E. coli* DH5α, содержащих плазмиду pHV33-mob/*recD*, проводили на питательной среде с 100 мкг/мл Ap и 40 мкг/мл Tc. Один из клонов *E. coli* DH5α с плазмидой pHV33-mob/*recD*, не выросший на питательной среде 40 мкг/мл Tc, но устойчивый к 100 мкг/мл Ap, был использован для выделения плазмидной ДНК. Полученную рекомбинантную плазмиду pHV33-mob/*recD* анализировали методом ПЦР с праймерами FtrecDL15 и FtrecDR15 и рестрикцией по *Sal*I сайту (рисунок 25). Далее плазмиду pHV33-mob/*recD* переносили в клетки штамма *E. coli* S17-1 методом трансформации. Отобранные Ap^RTc^S трансформанты клеток штамма *E. coli* S17-1 с плазмидой pHV33-mob/*recD* и проверенные в ПЦР с праймерами FtrecDL15 и FtrecDR15 использовали в качестве доноров при скрещивании с клетками штамма *F. tularensis* 15Δ*recD*. Селекцию конъюгантов *F. tularensis* 15Δ*recD* с плазмидой pHV33-mob/*recD* проводили на FT-агаре, содержащем 3 мкг/мл Cm. Один из выросших на FT-агаре

с 3 мкг/мл Cm клонов *F. tularensis* 15Δ*recD* (pHV33-mob/*recD*) использовали для изучения функциональной активности гена *recD*.

M 1 2 M 3 4

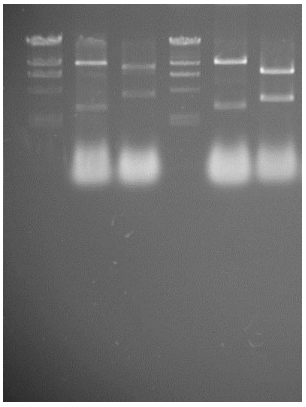


Рисунок 25 – Рестрикция плазмид pHV33-mob/*recA* и pHV33-mob/*recD* по *Sal*I сайту (верхняя полоса – плазмидная ДНК, нижняя полоса клонированный фрагмент).

Примечание: M – маркер λHind (23130, 9416, 6557, 4316, 2322, 2027, 564, 125 т.п.о.); 1– плазмида pPVΔ*recA*; 2 –плазмида pHV33-mob/*recA*; 3-плазмида pPVΔ*recD*; 4 – плазмида pHV33-mob/*recD*.

Таким образом, для изучения влияния генов *recA* и *recD* на биологические и иммунологические свойства *F. tularensis* 15/10 нами были сконструированы плазмиды pHV33-mob/*recA* с нативной копией гена *recA* и pHV33-mob/*recD* с функционально-активной копией гена *recD*. Полученные штаммы *F. tularensis* 15/10Δ*recA*(pHV33-mob/*recA*) и *F. tularensis* 15/10Δ*recD*(pHV33-mob/*recD*) в дальнейшем были использованы для изучения влияния генов *recA* и *recD* на свойства туляремийного вакцинного штамма.

3.3.5 Конструирование штаммов с делецией генов *bla1, bla2, bla3* на основе штамма 15 НИИЭГ *F. tularensis*

Наличие β-лактамазной активности используется, как диагностический признак, при определении подвидовой принадлежности, так как согласно данным Н.Г. Олсуфьева [55], у *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* лактамазная активность отсутствует. Впервые ген, кодирующий белок туляремийного микроба с β-лактамазной активностью (*bla*A), был описан в 2003 г. в исследовании C.M. Lauriano [306] у *F. tularensis* subsp. *novicida* U112. Позднее у штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS были выявлены два гена, кодирующих белки

типа сериновых β-лактамаз – *blaA* и *blaB,* причем только один ген *bla*B (FTU-1) кодировал функционально активный белок, обеспечивающий резистентность к ампициллину [124, 324]. Исследователи отмечали низкий процент гомологии FTU-1 *F. tularensis* с другими β-лактамазами, не превышающий 35,0 %. В дальнейшем аналоги FTU-1были обнаружены еще у 14 штаммов всех 4 подвидов туляремийного микроба, в том числе и у штамма *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* FSC147. Таким образом, наличие функционально активной β-лактамазы вступает в противоречие с постулируемым отсутствием β-лактамазной активности у штаммов среднеазиатского подвида. Мы предположили, что различия в β-лактамазной активности у штаммов различных подвидов могут быть обусловлены такими причинами, как различие спектра β-лактамаз, различия в последовательности гомологичных белков или в расположении кодирующих их генов, что может влиять на уровень экспрессии фермента. Анализ разнообразия генов β-лактамаз в геномах штаммов *F. tularensis in silico* показал, что, кроме двух описанных ранее генов, мы выявили еще один, предположительно кодирующий металло-β-лактамазу. В опубликованных работах ранее описанные гены лактамаз получили разное название. Во избежание путаницы с названиями этих генов мы обозначили их как гены *bla*1 (обнаруженная нами металло-β-лактамаза), *bla*2 (ранее описанная как *bla*B и *bla*2) и *bla*3 (называемая в других работах *bla*A и *bla*1). Кроме того, при анализе *in silico* аминокислотной последовательности фермента в штамме *F. tularensis* LVS, обозначенного в базе данных NCBI, как арилсульфатаза, ген которого перекрывается с геном *bla*3, мы выявили консервативный домен, характерный для β-лактамаз класса B. Таким образом, в процессе исследований у *F. tularensis* LVS было выявлено 4 белка с установленной или предполагаемой β-лактамазной активностью, обозначенные нами *bla1, bla2, bla3* и *ars* (таблица 22).

Аннотированные геномы всех штаммов *F. tularensis,* доступные на момент написания работы, вне зависимости от подвидовой принадлежности имели сходный состав генов β-лактамаз, включая *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, который, как считается, не обладает лактамазной активностью.

Таблица 22 – β-лактамазы *F. tularensis* LVS

Обозначение гена	Обозначение белка	Молекулярный класс	Номер последовательности в базе NCBI	
			ген	белок
bla1	Bla1	B	FTL_1440	YP_514095.1
bla2	Bla2	A	FTL_0879	YP_513599.1
bla3	Bla3	A	FTL_0957	YP_513668.1
ars	Ars	B	FTL_1439	YP_514094.1

Присутствие в геноме *F. tularensis* нескольких хромосомных β-лактамаз, а также возможный вклад в антибиотикоустойчивость других факторов, предполагает, что устойчивость туляремийного микроба к β-лактамам может быть многофакторным механизмом. Для изучения роли β-лактамаз в обеспечении устойчивости возбудителя туляремии к β-лактамным антибиотикам нами была проведена работа по последовательной инактивации кодирующих их генов у штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ. Несмотря на то, что уже проводились работы по инактивации генов *bla*2 и *bla*3 у *F. tularensis* subsp. *novicida* 112 [306, 324], вклад в антибиотикоустойчивость белка Bla1 не оценивался и, кроме того, не оценивалась антибиотикочувствительность двойных и тройных мутантов. Ранее определялась устойчивость полученных мутантов только к ампициллину, но не к представителям других групп β-лактамных антибиотиков – карбапенемам и цефалоспоринам, либо же оценивалась активность белка по отношению к широкому ряду антибиотиков, но сам фермент был при этом клонирован в гетерологичном оранизме – *E.coli*.

Инактивацию генов β-лактамаз проводили методом сайт-направленного мутагенеза, используя для трансформации суицидные плазмиды pGM5 или pGM6.

Для получения фрагментов хромосомной ДНК с делециями генов *bla1, bla2, bla3* и *ars* были сконструированы праймеры, указанные в таблице 23, комплементарные участкам ДНК, фланкирующих гены *bla1, bla2, bla3* и *ars* в хромосоме туляремийного микроба. С помощью этих праймеров в ПЦР были наработаны фрагменты ДНК, фланкирующие гены β-лактамаз у *F. tularensis*. Полученные ампликоны обрабатывались эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и

*Bgl*II в зависимости от того, какой сайт рестрикции содержался в праймерах, и попарно лигировались между собой, после чего продукт лигирования был обработан эндонуклеазой рестрикции *Sal*I. После этого полученные фрагменты разделяли электрофорезом в 1%- агарозном геле при 180В в течении 45 мин, что позволяло отделить целевой фрагмент, представляющий из себя лигат 5′ и 3′-фланкирующих ген областей (так называемых левого и правого плеча) от димеров этих плеч. После очистки из геля целевые фрагменты, фланкированные сайтами рестрикции для *Sal*I, лигировали либо с предварительно обработанной той же рестриктазой плазмидой pGM5, либо с обработанной рестриктазой *Xho*I плазмидой pGM6 при молярном соотношении вектора и вставки 1:1. После этого лигазной смесью трансформировали клетки *E.coli* DH5ά или *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Отбор клонов, несущих плазмиду, проводили на FT-агаре с хлорамфениколом (5 мкг/мл). Из отобранных клонов *E.coli* DH5ά плазмида затем вновь выделялась и использовалась для трансформации *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Для подтверждения корректности структуры полученных мутантов использовали дополнительный вариант ПЦР с помощью праймеров, комплементарным внутренним областям целевого гена.

Таблица 23 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации 5'- и 3'-фланкирующих областей генов *bla1, bla2, bla3*

Ампли-фици-_руемый ген	Локали-зация (п.о.)[а]	Размер прай-мера (п.о.)*	Размер про-дукта (п.о.)	Праймер	Последовательность (от 5' к 3') и сайт рестрикции[б]
Левое плечо					
bla1	1366865-1366887	34	1123	Bla1-F1	AAAAAGTCGACTGAAATCCACCTATTGACAGGCT SalI
bla1	1367970-1367988	30		Bla1-R1	AAAAAAGATCTCAGGTCTTTTCCCAAGCGC BamHI
Правое плечо					
bla1	1368333-1368356	35	333	Bla1-F2	AAAAAGGATCCAAGCAAATACAAAGTTAAAAGCTC BamHI
bla1	1368332-1368356	36		Bla1-R2	AAAAAGTCGACTAGCTTTTAACTTTGTATTTGCTTC SalI

Продолжение таблицы

Ампли-фици-руемый ген	Локали-зация (п.о.)[а]	Размер прай-мера (п.о.)*	Размер про-дукта (п.о.)	Праймер	Последовательность (от 5' к 3') и сайт рестрикции[б]
Левое плечо					
bla2	856864-856885	33	533	Bla2-Fn1	AAAAAGTCGACAGTTCTGGTTATGACAGAGGAC SalI
bla2	857374-857396	34		Bla2-Rn1	AAAAAGGATCCCCAAGTAATGAAGAAATTATTCA BamHI
Правое плечо					
bla2	858027-858050	35	768	Bla2-Fn2	AAAAAAGATCTGCTTTCGTTATATTTGATGTTAGT BamHI
bla2	858774-858794	32		Bla2-Rn2	AAAAAGTCGACCTTGATTATTGTTATGTTGCG SalI
Левое плечо					
bla3	923465-923488	35	1463	Bla3-F1	AAAAAGTCGACAATATGTATGCAAGTTGAGTAAGG SalI
bla3	924900-924925	37		Bla3-R1	AAAAAAGATCTATTAAACAATACTACGAAAAATGCCT BamHI
Правое плечо					
bla3	925783-925809	38	371	Bla3-F2	AAAAAGGATCCATTCTAATTTAGAAACTATTTGAGGTT BamHI
bla3	926132-926153	33		Bla3-R2	AAAAAGTCGACACTCAACCAGCAATTAACTCAG SalI

Примечание: [а] Относится к геному *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS (Gen Bank NCBI, NC_007880.1);[б] Подчеркнуты сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции и указаны эндонуклеазы рестрикции;* п.о. – пар оснований (нуклеотидов).

Особенности получения мутантов по генам *bla:*

- мутантные штаммы с делецией гена *bla*1 и двойной мутант с инактивированными генами *bla*1 и *bla*3 были получены прямой электротрансформацией *F. tularensis* 15 НИИЭГ;

- при трансформации *E.coli* DH5ά на основе плазмиды pGM5 нам не удалось отобрать клоны, несущие плазмиду с целевой вставкой Δ*bla*2, Δ*ars*. Не удалось получить штаммы с делецией генов *bla*2 и *ars* и прямой

электротрансформацией *F. tularensis* 15 НИИЭГ плазмидами pGM5Δ*bla*2 и pGM5Δ*ars*.

В итоге нами было отобрано для дальнейшей работы по три клона каждого мутантного штамма с делециями генов β-лактамаз. Таким образом, нами был получен представительный ряд изогенных мутантов по всем обнаруженным в геноме *F. tularensis* генам бета-лактамаз, а также двойной и тройной мутанты с инактивированными генами *bla1, bla3* и *bla1, bla2* и *bla3,* соответственно.

Нам не удалось инактивировать ни одним из вышеописанных способов ген арилсульфатазы. Используя метод гомологичной рекомбинации с применением обеих плазмид – pGM5 и pGM6 – мы произвели многочисленные попытки инактивации этого гена путем его полной или частичной делеции введением в его последовательность стоп-кодонов, сдвигом его рамки считывания. Однако, во всех случаях после высева несущих плазмиду клонов на плотную питательную среду с сахарозой среди выросших колоний не обнаруживалось ни одного клона с целевой рекомбинацией. Более того, при попытке делетировать ген *ars* совместно с перекрывающимся с ним геном *bla1* нами в итоге был получен только 1 клон, у которого был делетирован лишь ген *bla1*, а ген *ars* оставался неизмененным, что указывает на то, что данный ген был восстановлен вследствие репарационных процессов. Возможно, активность кодируемого им фермента является жизненно важной для *F. tularensis,* поэтому инактивация этого гена приводит к тому, что мутантные штаммы становятся не жизнеспособными.

3.4 Обсуждение результатов

Ране считалось, что в бактериях рода *Francisella* плазмиды отсутствуют, однако в бактериях *F. novicida like* была обнаружена криптическая плазмида с неясной функцией, которая была названа pFNL10 [64]. Недавно также в природных изолятах *F. philomiragia* были обнаружены плазмиды pF242 и pF243 [309].

Плазмида pFNL10 способна реплицироваться в клетках *F. tularensis* и содержит все элементы для репликации по тета-механизму. Наличие в плазмиде pFNL10 генов, кодирующих белки, гомологичные белкам Phd-Doc системы,

обуславливает высокую стабильность наследования данной плазмиды бактериями *F. tularensis*. Плазмида pFNL10 являлась основой для создания многочисленных плазмидных векторов для *F. tularensis* [123, 323, 324, 331, 365]. Однако, её стабильная автономная репликация, высокая копийность и устойчивость в клетках *F. tularensis* сделали крайне затруднительным её элиминацию, к тому же, её невозможно использовать для аллельного обмена больших фрагментов.

Другим разрабатываемым подходом было использование гетерологичных плазмид. В 1991 году было показано, что конъюгативная плазмида pSa, относящаяся к IncW-группе несовместимости, обладает способностью переходить в результате скрещивания из клеток *E. coli* в клетки штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [76]. Было высказано предположение, что в бактериях *F. tularensis* плазмида pSa претерпевает существенные структурно-генетические перестройки, которые связаны либо с интеграцией плазмиды в хромосомную ДНК хозяина, либо с внутримолекулярными перестройками pSa в области локализации гена *cat* с возможной эксцизией этой области и рекомбинацией образующихся плазмид [75]. Тогда же было показано, что в клетках *F. tularensis* может реплицироваться не только плазмида pSa, но и плазмида pC194, выделенная из бактерий *Staphylococcus aureus* [75]. На основе плазмиды pC194 и широко используемой в генетических манипуляциях плазмиды pBR322 была создана бирепликонная плазмида pHV33, способная реплицироваться в клетках грамотрицательных и грамположительных бактерий [186]. Позднее было показано, что эта плазмида трансформирует и успешно реплицируется в клетках туляремийного микроба и сохраняется при пересевах на плотных питательных средах [44].

Для оптимизации условий мобилизационного межвидового переноса от клеток *E. coli* в клетки туляремийного микроба в плазмиду pHV33 нами был введен BamHI-фрагмент ДНК размером 1,7 т.п.н. с mob-областью плазмиды RP4, взятый из плазмиды pDM4 [232]. В результате трансформации *E. coli* были получены клоны, содержащие полноразмерную плазмиду pHV33mob, которые

росли на среде с ампицилином, и клоны с укороченной плазмидой pHV33’mob, полученные на среде с Cm. В pHV33’mob отсутствовал участок плазмиды pC194, прилегающий к области начала репликации. Возникший делеционный вариант плазмиды содержал гибридный ген *cat* под промотором гена *repH* плазмиды pC194, что привело к инактивации гена *repH,* что, в с вою очередь, обусловило низкую репликативную способность плазмиды и позволило рассматривать ее, как основу при создании суицидного вектора. Внутримолекулярная перестройка плазмиды pC194 в *E. coli* наблюдалась и другими авторами [238].

Ранее для аллельного обмена в геноме туляремийного микроба была использована сконструированная суицидная плазмида pPV [232]. Эти плазмида была создана на основе плазмиды pUC19, которая была выбрана в качестве репликона для сайт-направленного мутагенеза *F. tularensis* в связи с тем, что она не реплицируется в туляремийном микробе и содержит участок с уникальным набором сайтов для рестриктаз, удобных для встраивания фрагментов ДНК. Для проведения первичного отбора трансформантов был введен HindIII-фрагмент из плазмиды pSa, содержащий ген устойчивости к хлорамфениколу. В качестве селективного маркера был введен ген *sacB Bacillus subtillis*, позволяющий проводить отбор клонов с элиминированной плазмидой, и mob-область для проведения мобилизационного переноса в клетки туляремийного микроба. Используя два сайта для встраивания целевых фрагментов ДНК – *Sal*I и *Xba*I – впервые был проведен аллельный обмен и получены штаммы туляремийного микроба с делецией одной и двух копий гена *iglC* [232].

При дальнейших работах было обнаружено, что плазмида pPV при сайт-направленном мутагенезе туляремийного микроба при всех своих достоинствах имеет ряд недостатков: плазмида pPV может быть введена в клетки туляремийного микроба только путем мобилизационного переноса; трансформация клеток *F. tularensis* этой плазмидой проходит с крайне низкой эффективностью, недостаточной для проведения сайт-направленного мутагенеза; обязательно использование для клонирования фрагментов ДНК клеток *E. coli.* Однако, хромосома *E. coli* имеет отличный GC-состав по сравнению с

хромосомой *F. tularensis* , что может оказывать влияние на стабильность целевой вставки, и, в некоторых случаях, делая невозможным получение неизмененной нуклеотидной последовательности; кроме того, использование промежуточного этапа сборки рекомбинантных плазмид в *E. coli* требует проведения дополнительных стадий работы.

Учитывая все достоинства и недостатки сконструированных ранее плазмид, мы разработали новый суицидный вектор pGM5 на основе плазмиды pHV33'mob, которая практически не реплицируется в клетках туляремийного микроба, что приводит к его быстрой элиминации из реципиентных клеток. Введение гена *sacB B.subtillis* позволило проводить отбор клонов с элиминированной плазмидой на среде, содержащей сахарозу (5%). Созданная конструкция была пригодна для прямой трансформации в клетки туляремийного микроба. Последующая делеция mob-области и инактивация BamHI-сайта уменьшила размер конструкции, а введение фрагмента полилинкера, содержащего уникальные сайты узнавания плазмиды pBluescript IISK(-), позволяет использовать полученную плазмиду для клонирования целевых фрагментов.

Созданная суицидная плазмида pGM5 позволила нам получить штаммы с делетированными генами *qseC, purMCDN, recA, recD, iglC* (одной и двух копий), *bla1* и *bla3.*

В процессе получения штаммов с делецией некоторых генов, например, при инактивации гена *bla2* с помощью плазмиды pGM5, отобрать клон с целевой рекомбинацией не удавалось, хотя были предприняты попытки трансформации клеток *F. tularensis* непосредственно лигазной смесью. Анализ причин этих неудач заставил нас провести работы по модификации плазмиды pGM5. Из нее был удален фрагмент ДНК *E.coli* с неизвестной последовательностью, делетирован полилинкер pBlueskript IISK(-) и введены сайты рестрикции *Nhe*I, *Xba*I, *Xho*I, *Sal*I, *Eco*521. Полученная плазмида была названа нами pGM6. Эта плазмида позволила получить делеционный мутант *F. tularensis* 15 НИИЭГ по гену *bla2.* Тем не менее, нам не удалось делетировать ген *ars*. Возможно, активность кодируемого им фермента является жизненно важной для *F. tularensis,*

поэтому инактивация этого гена приводит к тому, что мутантные штаммы не выживают.

Созданные суицидные плазмидные векторы pGM5 и pGM6 являются новым инструментом, позволяющим повысить эффективность аллельного обмена в туляремийном микробе и имеющим ряд преимуществ перед ранее созданными плазмидами. Во-первых, они практически не реплицируются в клетках туляремийного микроба, что обуславливает их быструю элиминацию из реципиентных клеток; во-вторых, для отбора клонов с элиминированной плазмидой используют среду, содержащей сахарозу (5 %); в третьих, их передача в клетки *F. tularensis* проводится методом трасформации; в четвертых, трансфорировать клетки туляремийного микроба можно непосредственно лигазной смесью, избегая тем самым этапа промежуточной сборки рекомбинантных плазмид в *E. coli*.

Изучение свойств полученных штаммов с целенаправленно инактивированными генами позволит нам изучить и оценить их влияние на биологические и иммунные свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Глава 4 ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНОВ *QSEC, PURMCDN, RECA, RECD, IGLC* И *BLA* НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *F. TULARENSIS*

На основе вакцинного штамма *F. tularensis* 15НИИЭГ были получены новые варианты рекомбинантных штаммов с делециями генов *qseC, pur, recA, recD, iglC* (одной и двух копий) и *bla*. Получение штаммов с делециями этих генов преследовало разные цели, но изучение их иммунобиологических свойств проводили по определенной схеме, что позволило в дальнейшем разработать алгоритм для оценки рекомбинантных штаммов. Этот алгоритм состоял из первоначального этапа исследования полученных штаммов с делециями генов в системе *in vitro* – изучение ростовых свойств бактерий, чувствительности к нормальной кроличьей сыворотке (НКС), стабильности биологических свойств и способности к фагоцитозу на клеточных культурах. На следующем этапе исследования по изучению остаточной вирулентности и иммуногенности проводили *in vivo* с использованием мышиной модели экспериментальной туляремии.

4.1 Влияние гена *qseC* на иммунобиологические свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Многие бактерии регулируют синтез внеклеточных белков и контролируют экспрессию разнообразных фенотипических свойств посредством чувства кворума (ЧК) – механизма, зависящего от плотности клеточной популяции [182, 221, 325, 346]. ЧК – процесс продукции низкомолекулярных секретируемых или транспортируемых сигнальных молекул, называемых аутоиндукторами (АИ). Различные системы ЧК широко распространены среди грамотрицательных и грамположительных патогенных бактерий и играют важную роль в регуляции их патогенных свойств [12, 172, 178, 204, 483].

4.1.1 Влияние гена *qseC* на культурально-морфологические свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

При выращивании на плотной питательной среде FT-агаре мутантного штамма *F. tularensis* 15Δ*qseC* и исходного *F. tularensis* 15 НИИЭГ были найдены

отличия в скорости роста: первыми появлялись колонии *F. tularensis* 15Δ*qseC*– через 36-48 ч инкубации при температуре 37º С, колонии же *F. tularensis* 15 появлялись через 60-72 ч. Но при дальнейшей инкубации штамм дикого типа обгонял по размеру колоний мутантный штамм. Также были отмечены различия и по внешнему виду колоний: колонии мутантного штамма были более интенсивного сероватого цвета, имели более выпуклую форму, слегка напоминающую конус, и несколько более плотную консистенцию. По морфологии клетки мутантного и исходного штаммов не отличались друг от друга. Также не были отмечены различия в динамике роста при культивировании на жидкой питательной среде FTB при температурет 37 ºС. Время удвоения клеток составляло порядка 2 ч и лимитировалось содержанием кислорода в культуральной среде.

Полученные данные свидетельствуют, что мутация в гене *qseC* снижает скорость клеточного деления незначительно.

4.1.2 Влияние гена *qseC* на чувствительность к нормальной кроличьей сыворотке штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Устойчивость к бактерицидному действию нормальной кроличьей сыворотки является одним из важных свойств вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [71, 85]. Известно, что для вакцинного штамма туляремийного микроба характерна диссоциация колоний на S- и R-формы. Для R-формы характерно отсутствие О-антигена в структуре липополисахарида клеточной стенки, что обусловливает чувствительность штамма к сыворотке, поэтому такой штамм может использоваться в качестве положительного контроля. Дополнительно были проверены штаммы, комплементированные плазмидами pHV33 и pHVT, несущими интактный ген *qseC*.

Данные по изучению способности клеток различных штаммов *F. tularensis* противостоять действию бактерицидных компонентов НКС как в нативном, так и в инактивированным, виде приведены в таблице 24.

Таблица 24 – Влияние гена *qseC* на устойчивость к нормальной кроличьей сыворотке

F. tularensis, штамм	Число живых бактерий (lg КОЕ /мл) после 18 ч инкубации в:	
	НКС	инактивированной НКС
15 НИИЭГ	5,5±0,34	5,8±0,26
15 НИИЭГ R-форма	0	4,8±0,31
15Δ*qseC*	0	5,4±0,45
15Δ*qseC*/pHV33-*qseC*	0	5,7±0,23
15Δ*qseC*/pHVT-*qseC*	0	5,6±0,34

Нами показано, что мутантный штамм *F. tularensis* 15Δ*qseC*, как и штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ в R-форме, погибает в нормальной кроличьей сыворотке, в то время как родительский штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ хорошо сохраняется в этих условиях. Попытки комплементировать мутантный штамм *F. tularensis* 15Δ*qseC*, используя реплицирующиеся в нем плазмиды pHV33 и pHVT, содержащие структурную часть гена *qseC* (от SD-последовательности до терминирующего кодона включительно) под tet-промотором, не привели к восстановлению этого свойства.

Полученные данные свидетельствуют, что мутация в гене *qseC* изменила устойчивость *F. tularensis* к компонентам сыворотки. Однако, неудачные попытки по восстановлению этого свойства путем комплементации позволяют предположить, что проведенные генетические манипуляции по инактивации гена *qseC* в вакцинном штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ также затрагивают структуры, приводящие к такому изменению свойств клеточной стенки, которое свойственно родительскому штамму в R-форме.

4.1.3 Влияние гена *qseC* на способность рекомбинантного штамма к фагоцитозу и приживаемости в организме мышей линии BALB/c

Изучение способности фагоцитироваться макрофагами и приживаться в организме лабораторных животных является важной характеристикой штаммов. Эта оценка может играть ключевую роль при изучении свойств, влияющих на

вакцинные свойства, и является важной характеристикой при дальнейшей работе с этими штаммами.

Первый этап фагоцитоза включает в себя ассоциацию бактерий с поверхностью макрофага, после чего происходит поглощение бактерий фагоцитирующей клеткой. Этот показатель, оценивающий две начальные стадии фагоцитоза, учитывался нами как нулевая точка в результате высевов через 3 ч после внесения культуры. Данные представлены на рисунке 26.

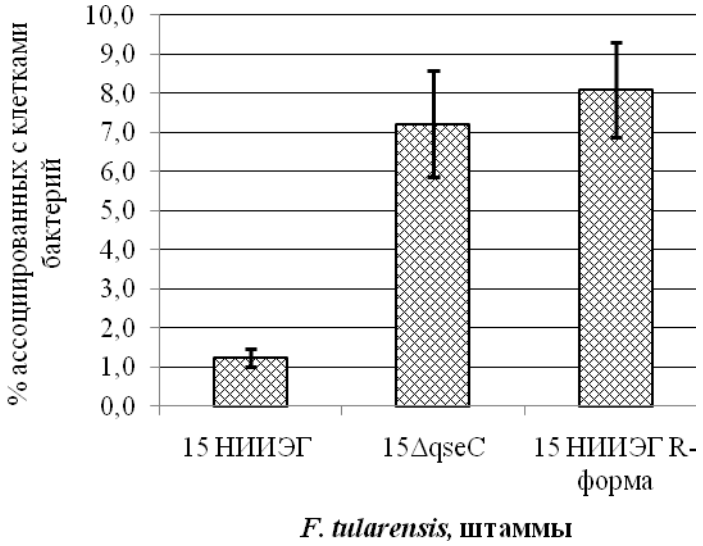


Рисунок 26 – Влияние делеции гена *qseC F. tularensis* на процесс связывания бактерий с мышиными макрофагами J-774.1A.

Примечание: Результаты представлены как процент бактерий, связанных с клетками, рассчитанный, как число ассоциированных и поглощенных макрофагами бактерий, разделенное на количество инокулированного материала и умноженное на 100.

Результаты наших исследований свидетельствуют, что способность мутантного штамма *F. tularensis* 15Δ*qseC* и R-формы штамма 15НИИЭГ ассоциироваться с макрофагами достоверно выше по сравнению с родительским штаммом.

Особое внимание при целенаправленном мутагенезе вакцинного штамма уделяется способности к внутриклеточному размножению, так как именно эта стадия *F. tularensis* является наиболее важной характеристикой штамма, если он рассматривается в качестве потенциальной вакцины. На рисунке 27 представлены

результаты внутриклеточного размножения штамма *F. tularensis* 15Δ*qseC* в сравнении с родительским штаммом 15НИИЭГ и его R-формой.

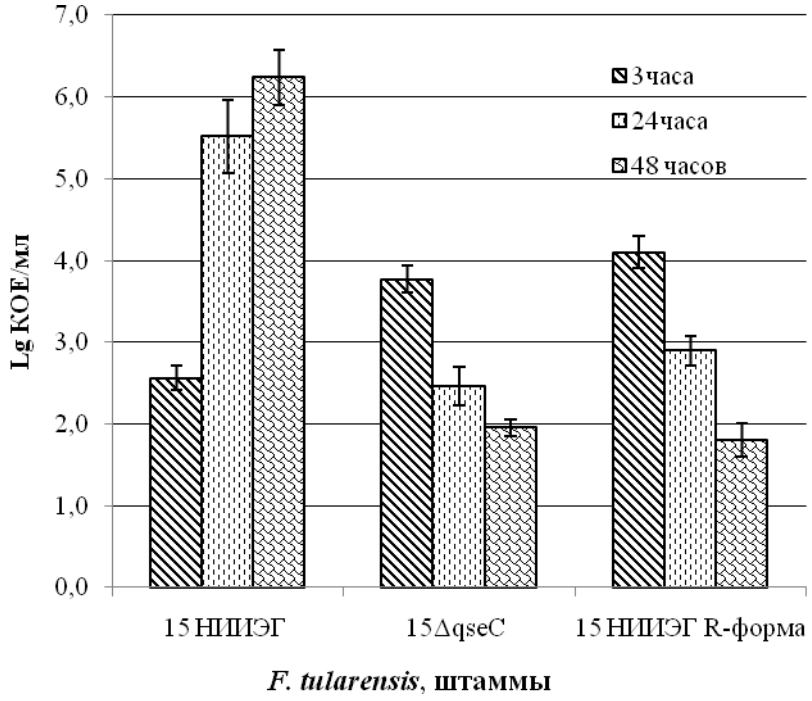


Рисунок 27 – Влияние делеции гена *qseC F. tularensis* на процесс внутриклеточного размножения бактерий в макрофагоподобных клетках линии J774.1A.

Примечание: Макрофаги инфицировались в соотношении 100:1, количество бактерий в лизате макрофагов определялось через 3, 24 и 48 ч после инфицирования; результаты показаны, как значение Lg КОЕ/мл ± доверительный интервал ($p<0,05$) по результатам трех независимых экспериментов.

Показано, что штамм с делецией гена *qseC*, как и R-форма вакцинного штамма, теряли способность к внутриклеточному размножению в макрофагах J774.1A; между этими штаммами не было достоверных различий. Исходный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ успешно размножался внутри макрофагов в течение 48 ч.

Полученные данные свидетельствуют, что мутация по гену *qseC* приводит к значительному снижению способности *F. tularensis* к внутриклеточному размножению. Учитывая схожесть результатов, полученных при изучении R-формы штамма 15 НИИЭГ, можно считать это дополнительным подтверждением того, что делеция гена *qseC* приводит к сходному с R-формой изменению структуры клеточной стенки туляремийного микроба.

Еще одной важной характеристикой штамма является его способность приживаться и персистировать в организме в течение определенного времени [49].

Мы оценивали приживаемость исходного *F. tularensis* 15 , его R-формы и штамма с делецией гена *qseC* по обсемененности селезенок мышей линии BALB/c на 4, 7, 14 и 21 сутки после подкожного введения. Данные приведены на рисунке 28.

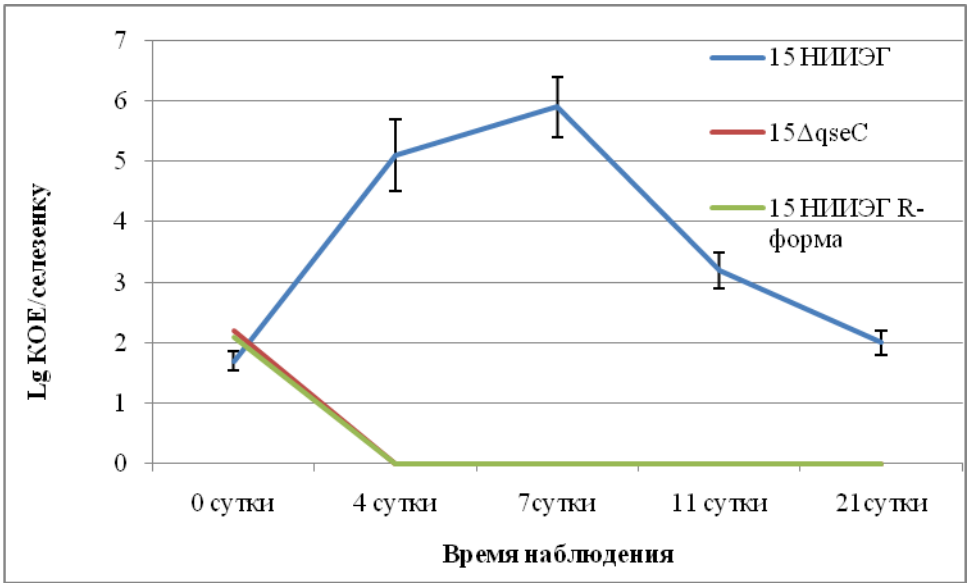


Рисунок 28 – Влияние делеции гена *qseC F. tularensis* на процесс размножения туляремийного микроба в селезенке мышей линии BALB/c.

Примечание: Доза иммунизации для штамма 15НИИЭГ – 50 м.к./мышь, для штаммов 15Δ*qseC* и R-формы –2×10^2 м.к./мышь. Результаты показаны, как значение Lg КОЕ/орган с доверительным интервалом ($p < 0.05$)

Показано, что, в отличие от родительского штамма, R-форма штамма 15 НИИЭГ и штамм с делецией гена *qseC* не способны к персистенции в организме мышей (рисунок 28), что коррелирует с данными по внутриклеточному размножению в макрофагоподобных клетках (рисунок 27).

Эти результаты явились дополнительным фактором, подтверждающим схожесть свойств R-формы штамма 15 и штамма с делецией гена *qseC*, что свидетельствует о необходимости изучения структуры ЛПС полученного рекомбинантного штамма *F. tularensis* 15Δ*qseC*.

4.1.4 Влияние гена *qseC* на остаточную вирулентность и протективные свойства *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Определение остаточной вирулентности является одной из важных характеристик штаммов туляремийного микроба. Мы показали, что делеция гена *qseC* приводит к тому, что рекомбинантный штамм *F. tularensis* 15Δ*qseC* теряет устойчивость к НКС и способность размножаться в макрофагоподобных клетках J774.1A. Поэтому определение остаточной вирулентности проводили в широком диапазоне доз 10-10^9 м.к./мышь при подкожном и внутрибрюшинном введении. В качестве контроля были исследованы исходный родительский штамм и его R-форма. Кроме того, были изучены штаммы, комплементированные плазмидами pHV33 и pHVT, несущими интактный ген *qseC*. Погибших животные вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию (таблица 25). За оставшимися в живых животными велось наблюдение в течение 28 дней.

Таблица 25 – Влияние гена *qseC F. tularensis* на остаточную вирулентность для мышей Swiss Webster

F. tularensis, штамм	LD_{50}, м.к./мышь	
	подкожное введение	внутрибрюшинное введение
15 НИИЭГ	316,0 (190÷450)	8,5 (0,8÷20,1)
15 НИИЭГ R-форма	$>10^9$	$>10^9$
15ΔqseC	$>10^9$	$8,4\times10^8$ ($4,5\times10^8 \div 8,2\times10^9$)
15Δ*qseC*/pHV33-*qseC*	$>10^9$	$7,8\times10^8$ ($3,6\times10^8 \div 9,3\times10^9$)
15Δ*qseC*/pHVT-*qseC*	$>10^9$	$8,1\times10^8$ ($3,9\times10^8 \div 7,8\times10^9$)

Представленные результаты свидетельствуют, что при подкожном введении штамма с инактивированным геном *qseC* даже доза 10^9 м.к./мышь не вызывает гибели мышей, LD_{50} при внутрибрюшинном введении этого штамма также приближена к 10^9 ($8,4\times10^8$) м.к./мышь. Плазмидосодержащие штаммы с клонированным *qseC* геном не восстановили остаточной вирулентности, присущей родительскому штамму *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Следует отметить, что

эти данные сопоставимы с данными по остаточной вирулентности для R-формы вакцинного штамма (таблица 25).

При определении протективых свойств мутантного штамма *F. tularensis* 15Δ*qseC* мышей Swiss Webster (по 5 мышей в группе) иммунизировали внутрибрюшинно дозами от 5×10^1 до 5×10^8 м.к./мышь с кратностью 10. Защитные свойства оценивали по выживаемости мышей после внутрибрюшинного заражения штаммом *F. tularensis* 15 дозой 5×10^4 м.к./мышь (1000 LD_{50}) через 28 дней после иммунизации. В качестве контроля были взяты интактные мыши, зараженные той же дозой. Полученные результаты представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Оценка протективных свойств штамма *F. tularensis* 15Δ*qseC* для мышей Swiss Webster

Доза иммунизаци, м.к./на мышь	Доза заражения, м.к./на мышь	Кол-во мышей в группе	Кол-во выживших	% выживших	Сроки гибели, дней
контроль	5×10^4	5	0	0	4, 4, 4, 4, 5
5×10^1		5	0	0	4, 5, 8, 9, 9
5×10^2		5	2	40	5, 6, 12, >21, >21
5×10^3		5	2	40	6, 7, 11, >21, >21
5×10^4		5	4	80	7, >21, >21, >21, >21
5×10^5		5	5	100	>21, >21, >21, >21, >21
5×10^6		5	5	100	>21, >21, >21, >21, >21
5×10^7		5	5	100	>21, >21, >21, >21, >21
5×10^8		5	5	100	>21, >21, >21, >21, >21

Согласно данным таблицы 26, протективность штамма *F. tularensis* 15Δ*qseC* для мышей при внутрибрюшинном заражении штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ дозой 1000LD_{50} после однократной внутрибрюшинной иммунизации имеет дозозависимый характер. Малая доза иммунизации 5×10^1 м.к./мышь вызывала увеличение продолжительности жизни до 7 дней (4,2 дня), средние дозы – от 5×10^2 до 5×10^4 м.к./мышь – обеспечивали частичную защиту от 40 до 80%, при дозе иммунизации 5×10^5 м.к./мышь и выше штамм *F. tularensis* 15Δ*qseC* на 100 % защищал мышей от последующего заражения. Таким образом, рекомбинантный

штамм значительно снижал вирулентность, полную защиту от последующего заражения обеспечивали только дозы иммунизации 5×10^5 м.к./мышь и выше.

4.1.5 Влияние делеции гена *qseC* на структуру липополисахарида внешней мембраны штамма 15 НИИЭГ *F. tularensis*

При изучении иммунобиологических свойств штамма с делецией гена *qseC* было показано, что его свойства аналогичны свойствам R-формы штамма 15 НИИЭГ. К моменту проведения наших работ структура липополисахарида природных штаммов *F. tularensis* была достаточно хорошо изучена.

Было показано, что, как и у большинства других грамотрицательных бактерий, ЛПС диких штаммов *F. tularensis* состоит из О-полисахарида (О-антигена), присоединенного к липиду А через олигосахарид кора (S-форма ЛПС) [470, 471] (см. структуры 1 и 2, соответственно, приведенные на рисунок 29).

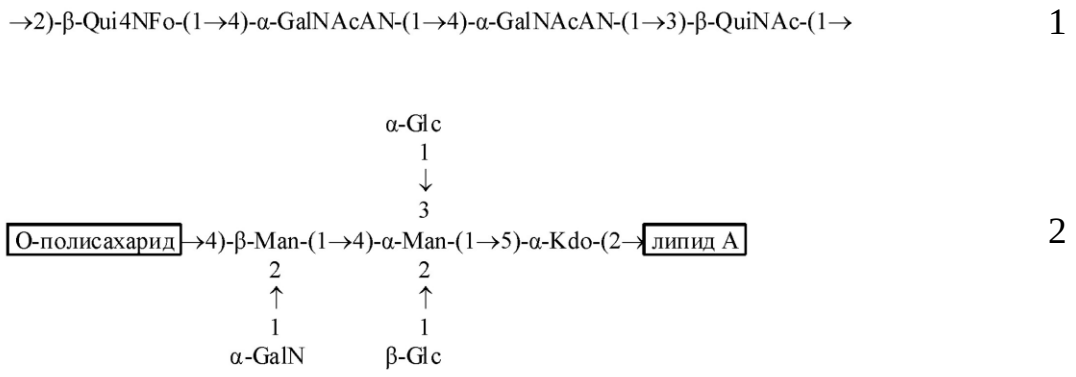


Рисунок 29 – Структуры повторяющегося звена О-полисахарида *F. tularensis* 15 [471] и АТСС 29684 [470] (*1*) и олигосахарида кора *F. tularensis* АТСС 29684 [471] (*2*)

Ds-Na-ПААГ-_электрофорез и иммуноблоттинг с моноклональными антителами, специфичными к ЛПС *F. tularensis*, показал существенное различие фенотипов ЛПС исходного штамма *F. tularensis* 15 и мутанта *F. tularensis* 15Δ*qseC* (рисунок 30). В частности, независимо от способа выделения ЛПС (по методу Вестфаля [480] или Галаноса [222]), «зеброподобные» полосы ЛПС с высокомолекулярным О-полисахаридом, характерные для исходного штамма, у мутантного штамма выражены слабо и находятся в значительно более узком интервале распределения по молекулярному массе.

.

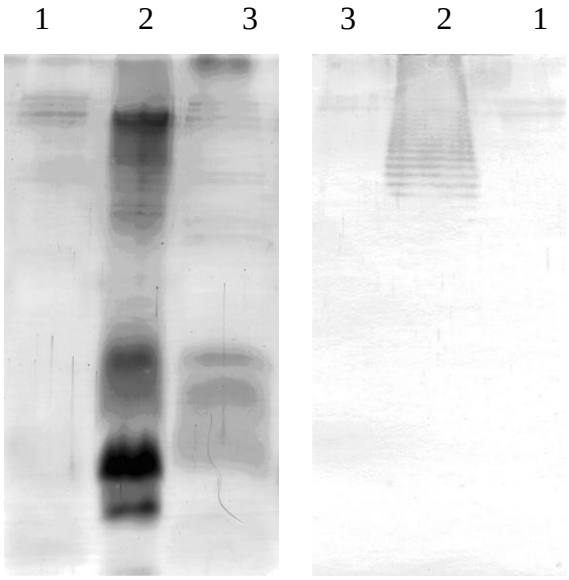
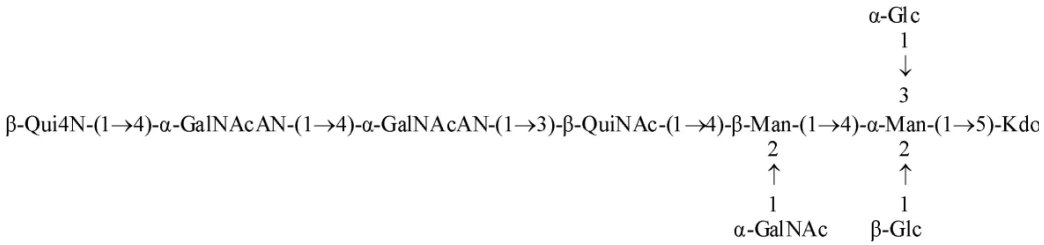


Рисунок 30 – (А) – Ds-Na-ПААГ-электрофорез в 15 %-ном ПААГ-е; (Б) – иммуноблоттинг с моноклональными антителами.

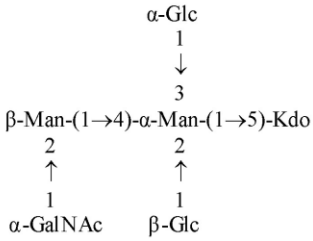
Примечание: 1 – препарат ЛПС *F. tularensis* 15Δ*qseC* (выделение по Галаносу); 2 – препарат ЛПС *F. tularensis* 15 (выделение по Вестфалю); 3 – препарат ЛПС *F. tularensis* 15Δ*qseC* (выделение по Вестфалю)

Мягкий кислотный гидролиз ЛПС, выделенного из клеток *F. tularensis* 15Δ*qseC* водно-фенольной экстракцией по методу Вестфаля [480] с последующей колоночной хроматографией на геле Sephadex G-50, привел к выделению двух олигосахаридных фракций (ОС1 и ОС2). Высокомолекулярный О-полисахарид в сколько-нибудь заметных количествах при этом не был обнаружен.

Полученные олигосахариды исследовали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением. Было показано, что масс-спектр ОС1 соответствует ЛПС SR-формы мутантного штамма, в котором к кору присоединен не высокомолекулярный О-полисахарид, а низкомолекулярный О-антиген, состоящий из одного повторяющегося звена. Его отличительной особенностью является отсутствие формильной группы, которая в О-полисахариде исходного штамма *F. tularensis* 15 находится на остатке 4-амино-4,6-дидезоксиглюкозы (Qui4N) (рисунок 31, структура 1 (ОС1).



1



2

Рисунок 31 – Структуры основных олигосахаридов во фракциях ОС1 (1) и ОС2 (2), полученных при мягкой кислотной деградации ЛПС SR-формы и R-формы *F. tularensis* 15Δ*qseC*

В масс-спектре фракции ОС2 присутствовал пик гексасахарида, отвечающего полному кору Hex4HexN1Kdo1Ac1 Он образовался из ЛПС R-формы мутантного штамма, не содержащей О-антигена. Можно предположить, что отсутствие на концевом остатке Qui4N *N*-ацильного заместителя (формильной группы) препятствует дальнейшему удлинению цепи О-полисахарида, в результате чего мутантный штамм *F. tularensis* 15Δ*qseC* не продуцирует заметных количеств ЛПС S-формы с высокомолекулярным О-полисахаридом. Сравнение масс-спектров препаратов липида А, выделенных после мягкой кислотной деградации ЛПС *F. tularensis* 15 и *F. tularensis* 15Δ*qseC*, не выявило отличий между ними.

Полученные результаты, с учетом литературных данных о строении ЛПС дикого штамма *F. tularensis* [470, 471], позволяют установить полную структуру ЛПС мутантного штамма *F. tularensis* 15Δ*qseC*, представленную на рисунке 32.

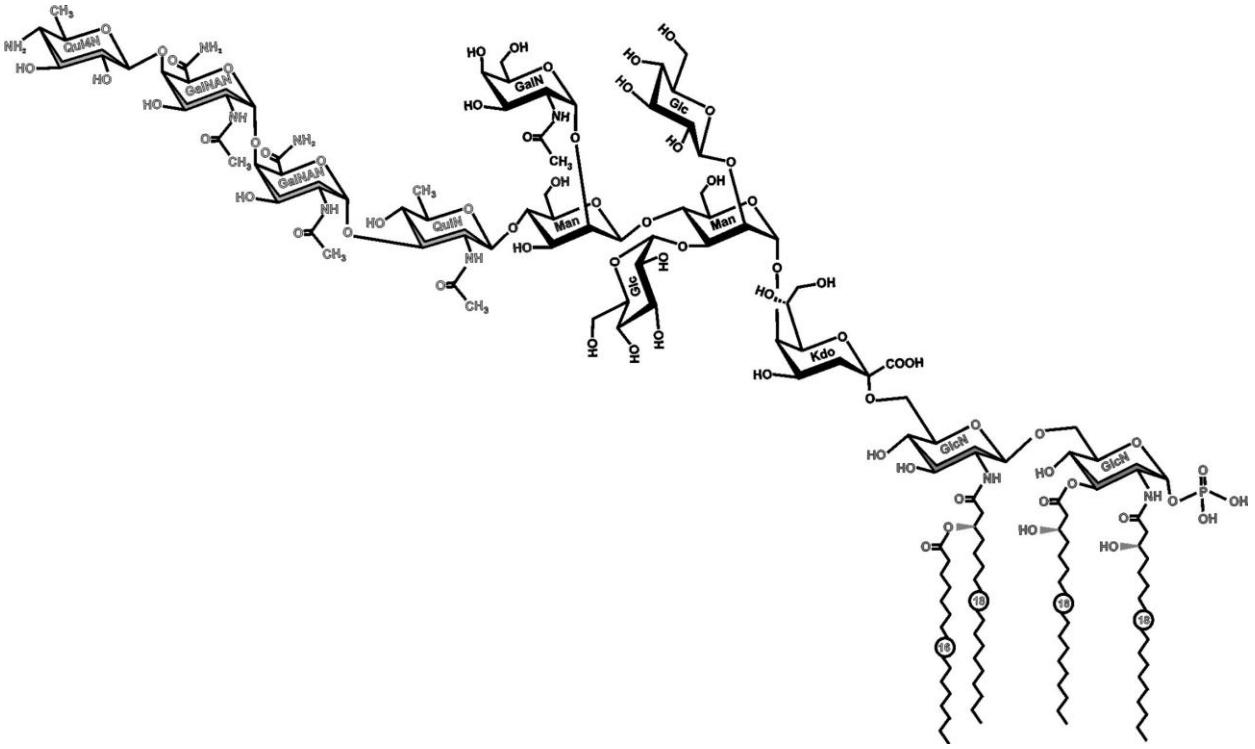


Рисунок 32 – Структура ЛПС *F. tularensis* 15ΔqseC.

*Примечание:*Показана полная углеводная цепь ЛПС SR-формы и доминирующий вариант липида А. Звено О-антигена (слева) и липид А (справа)

Инактивация гена *qseC* (или генов, которые могли быть затронуты при аллельном обмене) оказала также существенное влияние на фенотип ЛПС *F. tularensis*, являющегося важным фактором патогенности туляремийного микроба: бактерии утратили способность продуцировать ЛПС с высокомолекулярным О-полисахаридом. Это может являться следствием блокирования включения в повторяющееся звено *N*-формильной группы, перенос которой, по-видимому, контролируется геном *qseC*.

Таким образом, полученные данные показывают, что ген *qseC* играет важную роль в патогенезе туляремии. В результате делеции в гене *qseC* штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ стал авирулентен для мышей и потерял устойчивость к бактерицидному действию нормальной сыворотки. У штамма повысилась способность ассоциироваться с макрофагами, но снизилась способность к внутримакрофагальному выживанию. Возможно, утрата способности продуцировать типичный для *F. tularensis* ЛПС S-формы вызвана изменениями в экспрессии других генов, контролируемых геном *qseC* и системой «чувства кворума».

4.2 Влияние генов *purMCDN*, кодирующих ферменты биосинтеза пуринов, на иммунобиологические свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Инактивация генов, кодирующих ферменты биосинтеза пуринов ряда внутриклеточных бактериальных патогенов, включая *Salmonella* spp. [130. 314, 369], *Mycobacterium tuberculosis* [264], и *Brucella melitensis* [169], приводит к подавлению внутриклеточного размножения этих микроорганизмов, и, соответственно, к снижению их вирулентности. Тем не менее, вакцинация этими штаммами экспериментальных животных дает протективную защиту при заражении вирулентными штаммами.

Оперон *purMCDN* кодирует ферменты, участвующие в многоэтапном биосинтезе пуриновых нуклеотидов. Ген *purM*, предположительно, кодирует фермент, синтезирующий 5’-фосфорибозил-*N*-формилглицинамидин (FGAM), а ген *purCD* кодирует бифункциональный фермент, синтезирующий 5’-фосфорибозил -5-аминоимидазол карбоксильную кислоту (CAIR) и 5’-фосфорибозиламин (PRA). Ген *purN* кодирует фермент, синтезирующий 5’-фосфорибозил -1- глицинамид (GAR) [279]. Делеция этих генов лишает бактерии *F. tularensis* возможности размножаться в макрофагах и в клетках эпителия *in vitro*. По литературным данным [381], модификация штамма *F. tularensis* LVS путем замены генов *purMCD* на ген устойчивости к канамицину привела к появлению штамма, потерявшего способность размножаться в макрофагах. Однократная вакцинация таким штаммом недостаточна для формирования иммунитета, так как только небольшая доля бактерий попадает в легкие, не обеспечивая защиту организма от заражения. Однако двукратная вакцинация мышей этим же штаммом формирует у животных протективный иммунитет, сравнимый по протективности со штаммом LVS. Это позволяет рассматривать штаммы с целенаправленно выключеными генами, ответственными за биосинтез пуринов, как перспективные кандидаты при создании живых вакцин.

4.2.1 Влияние генов *purMCDN* на культурально-морфологические свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

При выращивании на плотной питательной среде FT-агаре мутантного штамма *F. tularensis* 15Δ*purMCDN* и исходного *F. tularensis* 15 НИИЭГ не были найдены отличия ни по скорости появления, ни по внешнему виду колоний: колонии как исходного, так и мутантного штаммов появлялись через 60-72 ч инкубации при температуре 37 ºС. Однако, если при выращивании на обедненной среде колонии исходного 15 НИИЭГ штамма появлялись через 96 часов, то колонии штамма 15ΔpurMCDN не вырастали без добавления в питательную среду источника пуринов (гипоксантина). По морфологии клетки мутантного и исходного штаммов, выращенные на FT-агаре, не отличались друг от друга. Отсутствовали различия и в динамике роста при культивировании на жидкой питательной среде FTB при температуре 37 ºС. Время удвоения клеток для обоих штаммов составляло порядка 2 ч (таблица 27).

Таблица 27 – Скорость роста и цикл клеточного деления исходного штамма 15НИИЭГ *F. tularensis* и его мутанта по генам *purMCDN*

F. tularensis, подвид, вирулентность	штамм	Время формирования колоний на твердой питательной среде, ч	Цикл клеточного деления на жидкой питательной среде, ч
15НИИЭГ ssp. *holarctica*; аттенуированный	исходный	72	2
	Δ*purMCDN*	72	2

Полученные данные свидетельствуют, что мутации в генах *purMCDN* не влияют на процесс клеточного деления в богатой питательной среде (таблица 27), однако, мутантный штамм очень чувствителен к недостатку пуриновых оснований в питательной среде.

4.2.2 Влияние генов *purMCDN* на чувствительность к нормальной кроличьей сыворотке

Как уже было отмечено выше, устойчивость к бактерицидному действию нормальной кроличьей сыворотки является одним из важных свойств вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [71, 85]. Полученные данные приведены в таблице 28 .

Таблица 28 – Влияние генов *purMCDN* на устойчивость к нормальной кроличьей сыворотке

F. tularensis, штамм	Число живых бактерий (lg КОЕ /мл) после 18 ч инкубации в:	
	НКС	инактивированной НКС
15 НИИЭГ	5,5±0,34	5,8±0,26
15Δ*purMCDN*	5,6±0,29	5,4±0,45

Показано, что мутантный штамм *F. tularensis* 15Δ*purMCDN* не отличается от родительского штамма 15 НИИЭГ и хорошо сохраняется в нормальной кроличьей сыворотке. Полученные данные свидетельствуют, что мутация в опероне *purMCDN* не влияет на устойчивость *F. tularensis* к компонентам сыворотки.

4.2.3 Влияние генов *purMCDN* на способность рекомбинантного штамма к фагоцитозу и приживаемости в организме мышей линии BALB/c

При оценке способности к фагоцитозу штамма с делецией по генам *purMCDN* было показано, что эта мутация не влияет на этап ассоциации бактерий с макрофагами (рисунок 33). Для штамма *F. tularensis* 15Δ*purMCDN* количество ассциированных с макрофагами микробных клеток составляло 2,2±0,19%, для родительского штамма этот показатель равнялся 1,9±0,28%.

Процесс внутриклеточного размножения для штамма с инактивированными генами *purMCDN* зависел от присутствия в культуральной среде источника пуриновых оснований – гипоксантина. На рисунке 33 представлены результаты

внутриклеточного размножения штамма *F. tularensis* 15Δ*purMCDN* в среде с гипоксантином и без него.

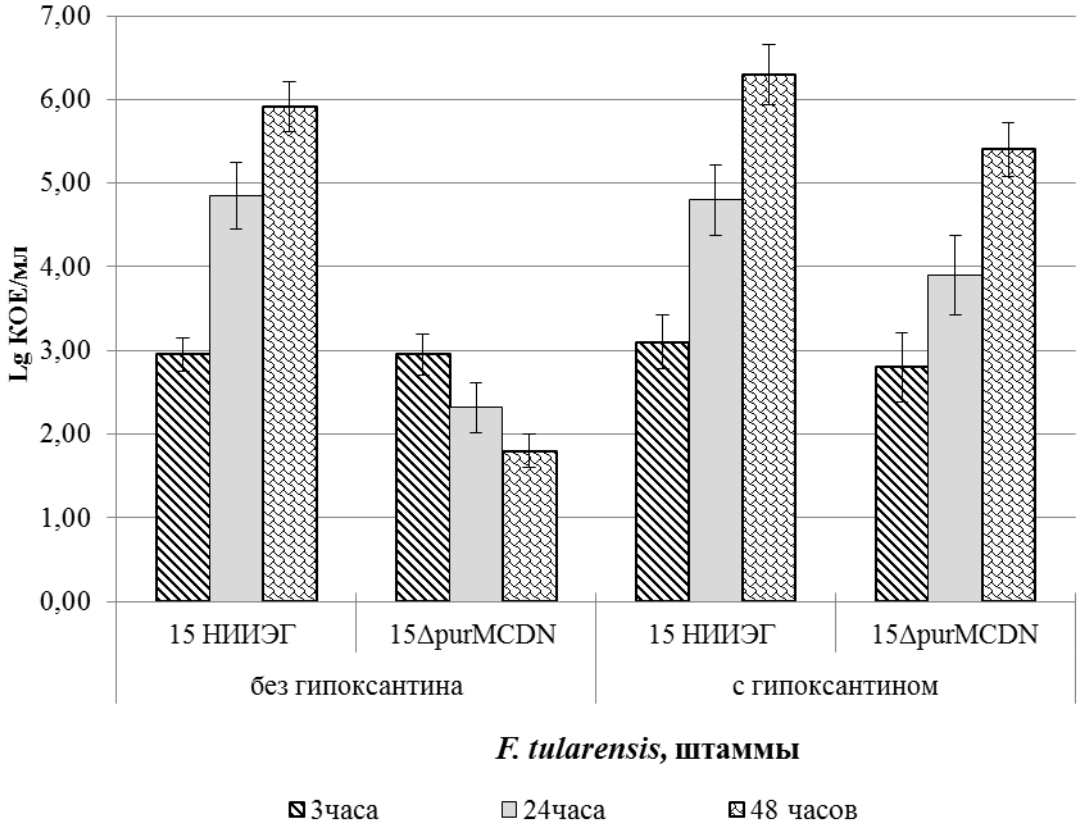


Рисунок 33 – Влияние делеции генов *purMCDN F. tularensis* на процесс внутриклеточного размножения бактерий в макрофагоподобных клетках линии J774.1A.

Примечание: Макрофаги инфицировались в соотношении 100:1 и культивировались в среде с гипоксантином и без него, количество бактерий в лизате макрофагов определялось через 3, 24 и 48 ч после инфицирования; результаты показаны, как значение Lg КОЕ/мл ± доверительный интервал ($p<0,05$) по результатам трех независимых экспериментов.

Показано, что штамм с делецией генов *purMCDN* терял способность к внутриклеточному размножению в макрофагах J774.1A, если в среду не добавлялся источник пуриновых оснований, а при дополнительном внесении в среду гипоксантина штамм 15Δ*purMCDN* восстанавливал эту способность. На исходный штамм *F. tularensis* 15НИИЭГ присутствие гипоксантина не оказывало никакого влияния, он успешно размножался внутри макрофагов в течение всего срока наблюдений (48 ч).

Полученные данные свидетельствуют, что только дополнительное внесение в среду культивирования источника экзогенных пуринов позволяет мутантному штамму размножаться в макрофагоподобных клетках, т.е. сохранять свойства исходного вакцинного штамма, подтверждая факт, что делеция генов *purMCDN* важна для возбудителя туляремии.

Оценку приживаемости штамма с делецией генов *purMCDN* и исходного *F. tularensis* 15 проводили по степени обсемененности селезенок мышей линии BALB/c на 4, 7, 14 и 21 сутки после подкожного введения (рисунок 34).

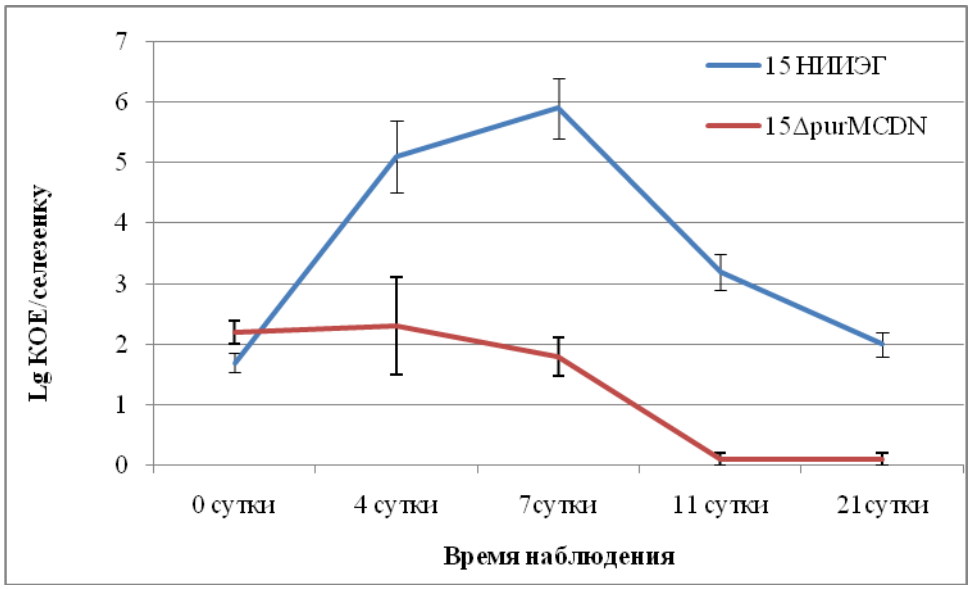


Рисунок 34 – Влияние делеции генов *purMCDN* на размножение туляремийного микроба в селезенке мышей линии BALB/c (доза иммунизации 50 м.к./мышь).
Примечание: Результаты показаны, как значение Lg КОЕ/орган с доверительным интервалом ($p < 0.05$).

Представленные результаты свидетельствуют, что штамм с делецией генов *purMCDN,* в отличие от родительского штамма, не имеет фазы размножения в организме мышей линии BALB/c. Количество высеваемых бактерий на 4-7 сутки не превышает количества бактерий, введенных при заражении, и к 11 суткам штамм практически полностью элиминируется из селезенки. В отличие от него исходный штамм имеет стадию нарастания высеваемых из селезенки бактерий в период 4-7суток, и стадию элиминации, начинающуюся с 11 суток, но даже к 21 суткам в селезенке сохраняются единичные клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (рисунок 35). Эти результаты подтверждают данные о потере способности к внутриклеточному размножению в макрофагах J774.1A в

отсутствии источника пуринов и позволяют предположить, что штамм с данной мутацией будет обладать сниженной вирулентностью.

4.2.4 Влияние генов *purMCDN* на остаточную вирулентность и протективные свойства *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Определение остаточной вирулентности для штамма *F. tularensis* 15*ΔpurMCDN* проводили на мышах линии BALB/c, используя диапазон доз 10^2-10^9 м.к./мышь при подкожном введении. В качестве контроля был исследован исходный родительский штамм с диапазоном доз 10-10^4 м.к./мышь. Данные приведены в таблице 29.

Таблица 29 – Влияние генов *purMCDN F. tularensis* на остаточную вирулентность для мышей линии BALB/c

F. tularensis, штамм	LD_{50}, м.к.
	подкожное заражение
15НИИЭГ	79,0 (40÷110)
15Δ*purMCDN*	$>10^9$

Представленные результаты свидетельствуют, что при подкожном введении штамма с инактивированными геноми *purMCDN* ни одна из введенных доз не является для мышей смертельной, поэтому LD_{50} для данного штамма превышает значение 10^9 м.к./мышь (таблица 29).

Для определения протективых свойств мутантного штамма изучали эффективность однократной и двукратной иммунизации. При однократной иммунизации штаммом *F. tularensis* 15*ΔpurMCDN* мышей линии BALB/c иммунизировали подкожно дозами 10^6, 10^7и 10^8 м.к./мышь, при двукратной иммунизации первая иммунизация была в тех же дозах, а повторно иммунизировали дозой 10^7 м.к./мышь. Защитные свойства оценивали по выживаемости мышей после подкожного и интраназального заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 (ssp. *holarctica*) и Schu (ssp. *tularensis*) через 28 дней после иммунизации. В качестве контроля были взяты интактные мыши. Полученные результаты представлены в таблицах 30 и 31.

Таблица 30 – Оценка протективных свойств штамма *F. tularensis* 15Δ*purMCDN* для мышей линии BALB/c при подкожном заражении

Количество вакцинаций	Доза иммунизации, м.к./мышь		Доза заражения, м.к./мышь	% выживших при заражении *F. tularensis* штаммом	
	1-я иммунизация	2-я иммунизация		503	Schu
контроль	-	-	4×10^3	0	0
Однократная иммунизация	10^6	-		20	0
	10^7	-		20	0
	10^8	-		40	0
Двукратная иммунизация	10^6	10^7		60	40
	10^7	10^7		20	20
	10^8	10^7		40	20

Таблица 31 – Оценка протективных свойств штамма *F. tularensis* 15Δ*purMCDN* для мышей линии BALB/c при интраназальном заражении

Количество вакцинаций	Доза иммунизаци, м.к./мышь		Доза заражения, м.к./мышь	% выживших при заражении *F. tularensis* штаммом	
	1-я иммунизация	2-я иммунизация		503	Schu
контроль	-	-	4×10^4	0	0
Однократная иммунизация	10^6	-		0	0
	10^7	-		0	0
	10^8	-		20	0
Двукратная иммунизация	10^6	10^7		40	0
	10^7	10^7		0	20
	10^8	10^7		20	0

Оценка протективности штамма *F. tularensis* 15Δ*purMCDN* для мышей линии BALB/c при подкожном и интраназальном заражении вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 и Schu показала, что штамм обладает слабыми защитными свойствами, при этом двукратная иммунизация более эффективна, чем однократная. Следует отметить, что, как при подкожном, так и при интраназальном заражении мутантный штамм лучше защищает от вирулентного

штамма 503, относящегося, как и вакцинный штамм, к голарктическому подвиду, защита от штамма Schu неарктического подвида неэффективна.

4.3 Влияние гена *iglC* на иммунобиологические свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Для внутриклеточного паразитирования бактерии *F. tularensis* синтезируют целый комплекс белков, кодируемых генами, расположенными на острове патогенности (ТОП – туляремийный остров патогенности, или FPI – Francisella Pathogenicity Island). Одним из ключевых генов этого региона является ген *iglC*. Он кодирует 23 кДа белок, синтез которого существенно увеличивается при попадании и размножении клеток туляремийного микроба в макрофагах [47, 235]. Отсутствие гомологии аминокислотной последовательности белка IglC с аминокислотными последовательностями известных белков позволяет полагать, что он является новым фактором вирулентности [235]. В геноме туляремийного микроба этот ген представлен двумя копиями, при их инактивации у возбудителя туляремии снижается вирулентность и способность к выживанию в макрофагах [233].

4.3.1 Влияние гена *iglC* на культурально-морфологические свойства и чувствительность к нормальной кроличьей сыворотке

Как показано в 4-ой главе (4.3.3), были получены два штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ: *F. tularensis* 15/23-1 – с одной инактивированной копией гена *iglC* и *F. tularensis* 15/23-2 – с двумя инактивированными копиями гена *iglC*. Для подтверждения влияния гена *iglC* на микробиологические и иммунологические свойства туляремийного микроба была проведена комплементация одного из инактивированных копий гена *iglC* в штамме *F. tularensis* 15/23-2.

При выращивании на плотной питательной среде FTA штаммов с одной и двумя делетированными копиями гена *iglC* видимых отличий в скорости роста и морфологии колоний отмечено не было. Также не были отмечены различия в динамике роста бактерий при культивировании на жидкой питательной среде FTB. Штамм 15/23-2 ком с комплементированным геном *iglC* имел ту же морфологию колоний и скорость роста, что и родительский штамм.

Инактивация одной и двух копий гена *iglC* в геноме вакцинного штамма туляремийного микроба не изменила способности полученных штаммов сохранять жизнеспособность в НКС по сравнению с родительским штаммом, свидетельствуя о том, что внесенной мутацией не были затронуты молекулярные структуры, обеспечивающие устойчивость туляремийного микроба к бактерицидным свойствам сыворотки. R-форма штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, взятая в качестве контроля, была высокочувствительна к НКС.

4.3.2 Влияние гена *iglC* на способность к фагоцитозу и приживаемости в организме мышей линии BALB/c

Ранее было показано, что модифицированные штаммы LVS без одной и двух копий гена *iglC* по-разному размножались в макрофагах [233]. Нашей задачей было изучение влияния инактивации одной и двух копий гена *iglC* на способность вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ захватываться, выживать и размножаться в клетках линии J774.1A и перитонеальных макрофагах мыши, а также приживаться в организме мышей линии BALB/c.

Для изучения способности к фагоцитозу макрофагоподобные клетки линии J774.1A и перитонеальные макрофаги были инфицированы штаммами *F. tularensis* 15, 15/23-1, 15/23-2 и 15/23-2ком и через 24 и 48 ч было определено количество живых микробных клеток, находящихся в макрофагах. Данные представлены на рисунке 35.

Полученные результаты свидетельствуют, что вакцинный штамм без одной копии гена *iglC* размножается в клетках J774.1A в 8-10 раз хуже, чем исходный штамм. Инактивация обеих копий гена *iglC* в хромосоме *F. tularensis* 15 приводит к появлению варианта, неспособного к внутриклеточному размножению. Способность к внутриклеточному размножению варианта *F. tularensis* 15/23-2 с двумя инактивированными копиями *iglC* гена была частично восстановлена после введения комплементирующей плазмиды, что подтверждает важность роли гена *iglC* в процессе размножения в макрофагах (рисунок 35).

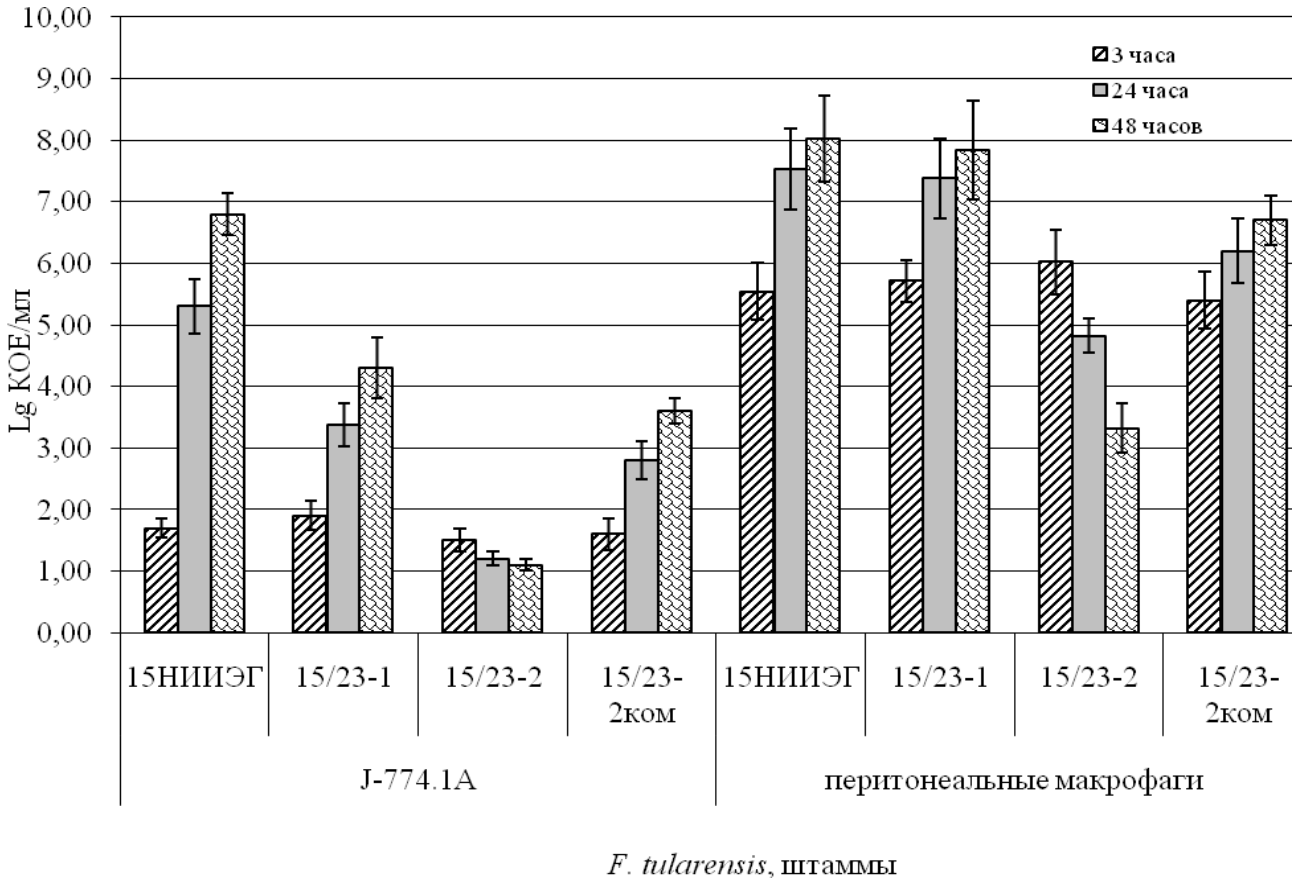


Рисунок 35 – Влияние гена *iglC F. tularensis* на процесс фагоцитоза бактерий макрофагоподобными клетками линии J774.1A и перитонеальными макрофагами мышей линии BALB/c.

Примечание: Макрофаги инфицировались в соотношении 100:1, количество бактерий в макрофагах определялось через 3, 24 и 48 ч после инфицирования; результаты показаны, как значение Lg КОЕ/мл ± доверительный интервал ($p<0,05$) по результатам трех независимых экспериментов.

Для перитонеальных макрофагов был характерен более активный захват бактериальных клеток по сравнению с макрофагоподобными клетками J774.1A, на что указывают результаты высевов бактерий из макрофагов через 3 ч после инфицирования Скорость размножения штаммов *F. tularensis* 15 и *F. tularensis* 15/23-1 в перитонеальных макрофагах через 24 и 48 ч практически не отличалась. Вакцинный штамм без обоих генов *iglC* в макрофагах не размножался (рисунок 35).

Приживаемость бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* и его производных в организме экспериментальных мышей линии BALB/c оценивали по степени обсемененности селезенки вводимым штаммом на 4, 7, 14 и 21 сут после инфицирования (рисунок 36).

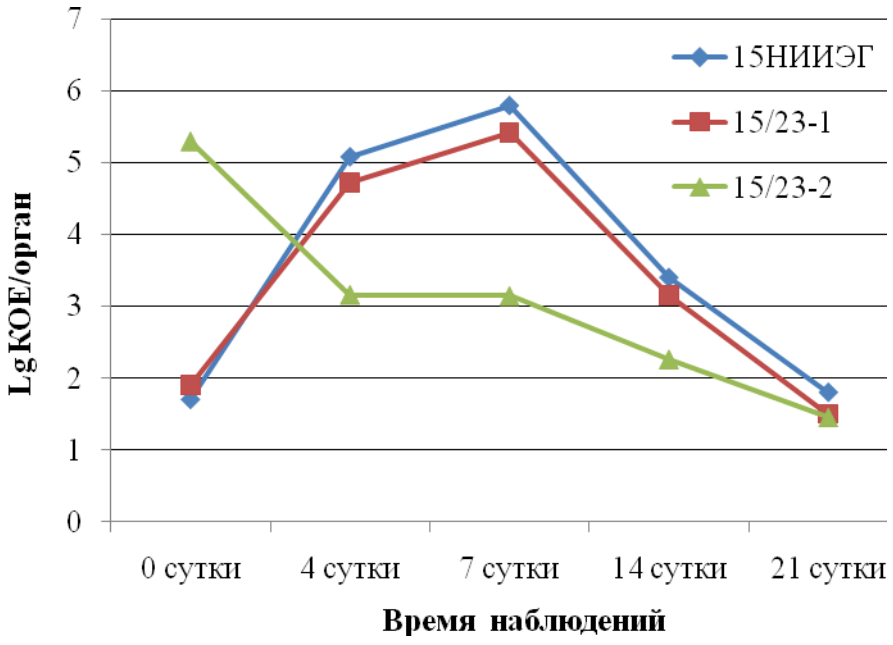


Рисунок 36 – Влияние гена *iglC F. tularensis* на способность бактерий к персистенции в организме мышей линии BALB/c

Примечание: Доза иммунизации для штаммов 15НИИЭГ и 15/23-1 - 50 м.к./мышь, для штамма 15/23-2 - 10^6 м.к./мышь. Результаты показаны, как значение Lg КОЕ/орган с доверительным интервалом (p <0,05).

Из приведенных на рисунке 36 данных следует, что наличие гена *iglC* позволяет штаммам *F. tularensis* 15 и 15/23-1, вводимым мышам линии BALB/c в дозе 50 м.к./мышь, не только сохранять жизнеспособность, но и размножаться в организме мышей в течение первых 7 сут. К 14 сут количество высеваемых из селезенки бактерий штаммов *F. tularensis* 15 и *F. tularensis* 15/23-1 уменьшалось примерно в 1000 раз, а на 21 сутки высевались единичные колонии.

Мутантный штамм *F. tularensis* без двух генов *iglC* при малой заражающей дозе 10^2 м.к./мышь не высевался из селезенок во все сроки наблюдений (данные не приведены). При более высокой заражающей дозе 10^6 м.к./мышь бактерии обнаруживались в организме мышей вплоть до 21 сут, но наблюдалось только плавное динамическое снижение бактериальной нагрузки на орган (рисунок 36).

Таким образом, инактивация гена *iglC* влияет на размножение туляремийного микроба в фагоцитирующих клетках и приживаемость этих штаммов в организме мышей линии BALB/c. Делеция одной копии гена снижает способность размножаться в клетках J774.1A на порядок, а инактивация обеих

копий гена *iglC* в хромосоме *F. tularensis* 15 приводит к появлению варианта, неспособного к внутриклеточному размножению в макрофагах. Способность этого штамма к персистенции в организме мышей (обязательное свойство для вакцинного штамма) сохраняется только при высокой заражающей дозе – 10^6 м.к./мышь.

Сравнение способности размножаться в макрофагоподобных клетках линии J774.1A и сохраняться в организме мышей линии BALB/c штаммов с инактивированными генами *iglC* (одной и двух копий гена) показало, что изучение мутантных штаммов на клеточной линии на первом этапе исследований позволяет проводить предварительный отбор перспективных кандидатов в вакцинные штаммы. Это же было показано и на штамме *F. tularensis* 15Δ*purMCDN* (раздел 4.2.3 данной главы) при изучении влияния генов *purMCDN* на свойства вакцинного штамма.

4.3.3 Оценка влияния гена *iglC* на степень остаточной вирулентности и протективные свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Определение остаточной вирулентности штаммов с инактивированной одной и двумя копиями гена *iglC* проводили на мышиной модели экспериментальной туляремии. Для штамма 15/23-1 инфицирование проводили в диапазоне доз 10-10^5 м.к./мышь, а для штамма *F. tularensis* 15/23-2, не способного к внутримакрофагальному размножению и ослабленной приживаемостью в организме мышей, диапазон доз был увеличен до 10^9 м.к./мышь.

Защитные свойства штаммов оценивали по выживаемости мышей после их заражения бактериями *F. tularensis* 503 в дозе 1×10^3 м.к./мышь (1000 DCL). Результаты по определению LD_{50} и ED_{50} для штаммов *F. tularensis* 15/23-1 и *F. tularensis* 15/23-2 приведены в таблице 32.

Определение остаточной вирулентности изучаемых штаммов показало, что инактивация одной копии гена *iglC* снижала LD_{50} штамма *F. tularensis* на порядок, а делеция обеих копий гена *iglC* делала штамм практически авирулентным (таблица 32).

Таблица 32 – Влияние инактивации гена *iglC* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на вирулентность и иммуногенность для мышей линии BALB/c

Штаммы *F. tularensis*	LD_{50}, м.к.	ED_{50}, м.к.
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

Протективность штамма *F. tularensis* 15/23-1 для мышей была сопоставима с защитой, обеспечиваемой родительским штаммом. Удаление обеих копий гена *iglC* приводило к исчезновению протективности, но наблюдалось увеличение средней продолжительности жизни (9,3 суток против 5,6 суток в контрольной группе).

4.3.4 Влияние гена *iglC* на реактогенные свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (по изменению веса и гематологическим показателям мышей линии BALB/c)

Для оценки влияния гена *iglC* на реактогенные свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ была изучена динамика изменения веса и гематологические показатели мышей линии BALB/c. Наблюдения за изменением веса у мышей проводили в течение 10 суток, результаты приведены на рисунке 37.

Наибольшее снижение веса (18,5-18,9%) вызывала вакцинация мышей линии BALB/c исходным вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, падение веса животных наблюдали со 2-ых суток, к 7 суткам падение веса достигало максимальных значений, которое сохранялось в течение всего периода наблюдений, вплоть до 10 суток. У мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1, падение веса, которое не превышало 9 %, наблюдали на 5-7 сутки. К 10-ым суткам вес мышей в этой группе возвращался практически к исходным значениям. У мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-

2 вес почти не изменялся и практически не отличался от колебания веса мышей в контрольной группе.

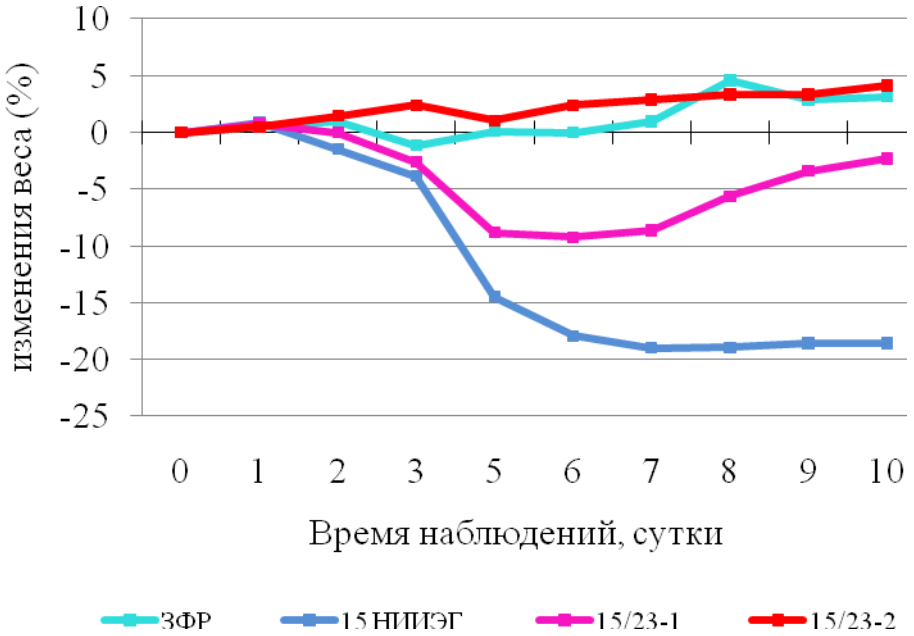


Рисунок 37 – Динамика изменения веса мышей линии BALB/c по отношению к первому дню иммунизации после вакцинации штаммами *F. tularensis.*

Примечание: Доза иммунизации для всех штаммов – 1×10^2 м.к./мышь. 15/23-1 – группа мышей, иммунизированных штаммом с инактивированной одной копией гена *iglC*; 15/23-2 - группа мышей, иммунизированных штаммом с инактивированными двумя копиями гена *iglC*; 15НИИЭГ – группа мышей, иммунизированных исходный вакцинный штаммом; ЗФР – контрольные мыши после введения ЗФР

Сравнительное изучение влияния иммунизации штаммами *F. tularensis* 15/23-1 и 15/23-2 и исходным вакцинным штаммом на гематологические показатели мышей показало, что количество эритроцитов и уровень гемоглобина иммунных животных не отличались от контрольных групп мышей – гемоглобин колебался в пределах (102÷128) г/л, количество эритроцитов – $(7{,}37\div9{,}42)\times10^{12}$/л.

Наиболее интересными при изучении динамики изменений гематологических показателей представляются изменения количества лейкоцитов и тромбоцитов (рисунок 38 А, Б).

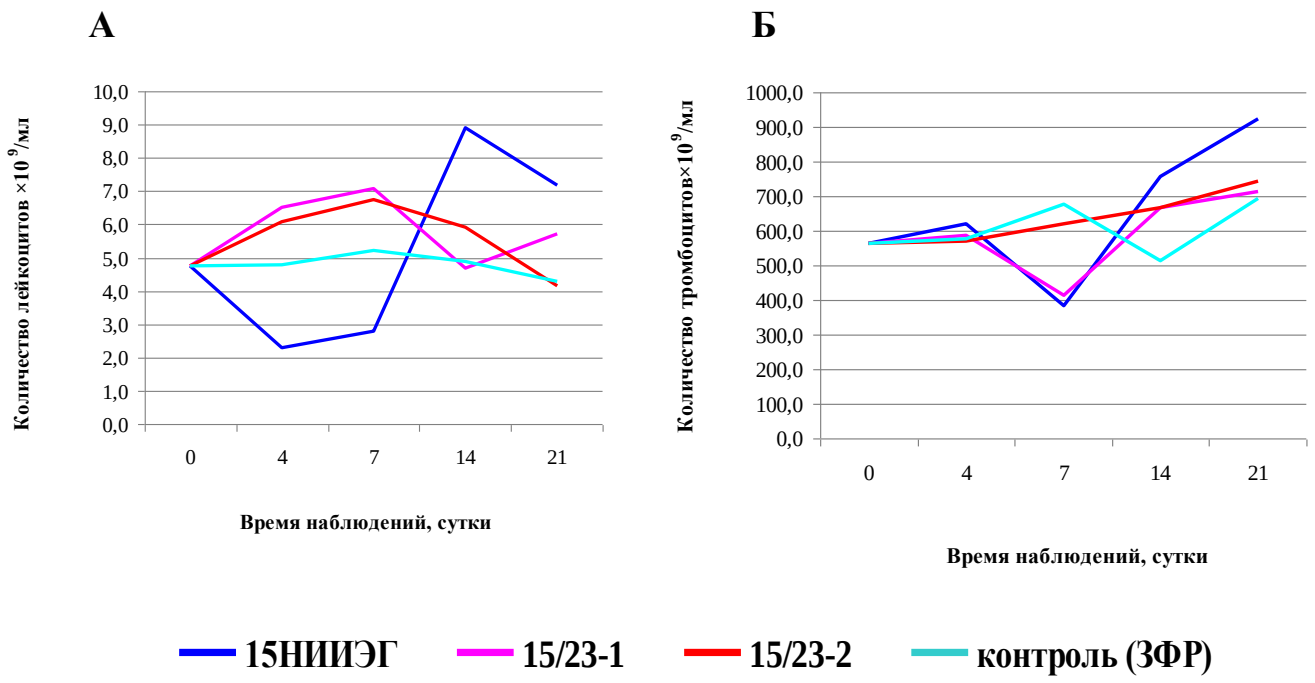


Рисунок 38 – Изменение количества лейкоцитов (А) и тромбоцитов (Б) мышей линии BALB/c после вакцинации штаммами *F. tularensis.*

Примечание: Доза иммунизации для всех штаммов – 1×10^2 м.к./мышь.

Наши исследования показали, что при иммунизации штаммом *F. tularensis* 15/23-1 (делеция одной копии гена *iglC*) у мышей не наблюдали лейкопении, лейкоцитоз был кратковременным на 14 сутки и незначительным, а к 21 суткам количество лейкоцитов нормализовалось. При иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ развивалась лейкопения в период 4-7 суток, которая сменялась лейкоцитозом в период 14-21 суток. Иммунизация штаммом *F. tularensis* 15/23-2 (делеция двух копий гена *iglC*) не вызывала изменений количества лейкоцитов в крови вакцинированных мышей (рисунок 38 А).

Изучение динамики изменения другого гематологического показателя – количества тромбоцитов – показало, что иммунизация мышей штаммом *F. tularensis* 15/23-1 и родительским штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ приводила к развитию тромбоцитопении, которая сменялась тромбоцитозом, причем наибольшие колебания этого показателя наблюдали после вакцинации последним (рисунок 38 Б).

Результаты изучения лейкоцитарной формулы крови мышей свидетельствуют, что при вакцинации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и

F. tularensis 15/23-1 в популяционном составе наблюдали увеличение содержания гранулоцитов и снижение количества лимфоцитов, а иммунизация штаммом *F. tularensis* 15/23-2 практически не изменяла эти показатели (таблица 33).

Дополнительно к вышеупомянутым параметрам был определен уровень гамма-интерферона в сыворотке иммунных мышей. Показано, что в сыворотках, полученных от мышей на 7 сутки после иммунизации, регистрировали повышение уровня гамма-интерферона, причем это повышение имело место при иммунизации исходным вакцинным штаммом и штаммом с инактивированной одной копией гена *iglC* – *F. tularensis* 15/23-1, а при иммунизации штаммом *F. tularensis* 15/23-2 количество гамма-интерферона в сыворотке не отличалось от уровня контроля (рисунок 39). Следует отметить, что повышение уровня гамма-интерферона у животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1, было несколько ниже (~на 200 пг/мл), чем у животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

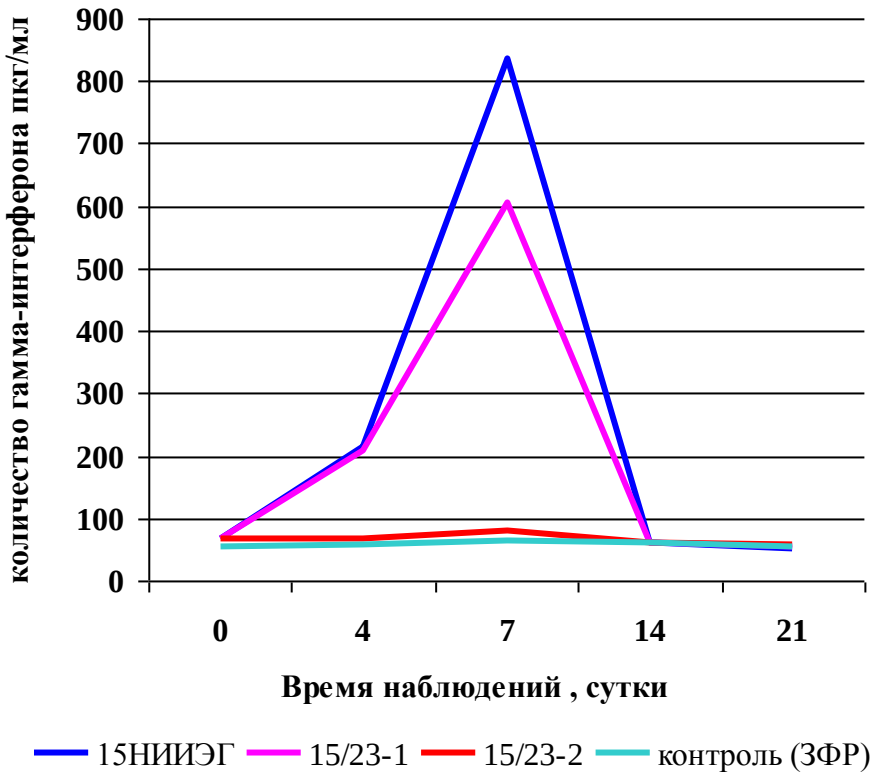


Рисунок 39– Изменение уровня гамма-интерферона в сыворотке крови мышей линии BALB/c после вакцинации штаммами *F. tularensis*.

Примечание: Доза иммунизации для всех штаммов – 1×10^2 м.к./мышь

Таблица 33 – Динамика гематологических показателей (лимфоцитов, гранулоцитов) мышей линии BALB/c после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его производных с делецией одной или двух копий гена *iglC*

Показатели крови	Штаммы *F. tularensis*	Время наблюдений				
		0 сутки	4 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Количество лимфоцитов×10^9/л	15 НИИЭГ	3,6±0,5	1,5±0,5	2,3±0,5	2,5±0,6	4,7±0,9
	15/23-1	3,8±0,4	2,8±0,6	3,7±0,8	3,1±0,7	5,3±1,5
	15/23-2	4,1±0,6	4,3±1,9	4,9±0,6	4,4±0,8	3,0±0,7
	Контроль (ЗФР)	4,1±0,3	3,9±0,6	3,8±0,4	4,6±0,3	4,5±0,5
Количество гранулоцитов×10^9/л	15 НИИЭГ	1,0±0,2	3,7±0,5	2,5±0,4	0,9±0,3	2,1±0,6
	15/23-1	1,3±0,6	3,3±0,8	3,0±0,7	1,3±0,4	1,6±0,3
	15/23-2	1,2±0,1	1,5±0,3	1,5±0,1	1,3±0,3	1,0±0,3
	Контроль (ЗФР)	1,0±0,3	1,4±0,2	1,0±0,2	1,4±0,3	1,2±0,2

Как известно, повышение синтеза гамма-интерферона в сыворотке крови отражает уровень воспалительного процесса [92, 107, 158]. Очевидно, что характер и степень изменения количества лейкоцитов и гамма-интерферона в наших исследованиях свидетельствуют о более выраженном инфекционно-воспалительном процессе при вакцинации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ по сравнению со штаммом *F. tularensis* 15/23-1, а штамм *F. tularensis* 15/23-2 не вызывает подобного процесса воспаления. Феномен тромбоцитопении, сменяющейся тромбоцитозом, выявленный нами при иммунизации штаммами *F. tularensis*15 НИИЭГ и *F. tularensis*15/23-1, требует более детального изучения для понимания патогенеза туляремийной инфекции.

Выявленные нами изменения таких параметров, как гематологические показатели, уровень гамма-интерферона в сыворотке крови мышей и изменение веса животных, могут служить критериями оценки реактогенности туляремийных штаммов с целенаправленными мутациями.

4.3.5 Влияние инактивации гена *iglC* в вакцинном штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на формирование гуморального и клеточного иммунитета к туляремии у мышей линии BALB/c

Оценку клеточного иммунитета к туляремии проводили по индуцированной продукции гамма-интерферона спленоцитами иммунизированных мышей линии BALB/c *in vitro*, а гуморального – по определению титра антител к суммарному туляремийному антигену.

На 21 сутки после вакцинации мышей линии BALB/c штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15/23-1 и *F. tularensis* 15/23-2 определяли концентрацию антител к суммарному туляремийному антигену (УЗД-*F. tularensis*). Данные по специфическому гуморальному иммунитету представлены в таблице 34.

Иммунизация штаммом *F. tularensis* 15/23-1 в дозе 10^2 м.к./мышь вызывала выработку специфических антител в титрах, сопоставимых с титрами, индуцируемыми родительским штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ (таблица34). В

то же время для штамма *F. tularensis* 15/23-2 иммунизация только более высокой дозой (10^5 м.к.) позволила получить сыворотки с титрами антител, сопоставимыми с индуцированными родительским штаммом.

Таблица 34 – Влияние инактивации гена *iglC* (одной и двух копий) в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на формирование гуморального иммунитета у мышей линии BALB/c

F. tularensis, штаммы	Доза вакцинации, КОЕ/мышь	Средние значения титров антител к УЗД *F. tularensis* (пределы колебаний)
15 НИИЭГ	10^2	1/400 (1/200÷1/800)
15/23-1	10^2	1/400 (1/200÷1/800)
15/23-2	10^2	1/100 (1/50÷1/200)
	10^5	1/400 (1/200÷1/800)

Напряженность клеточного звена иммунитета оценивали по индуцированному антигенами УЗД *F. tularensis* синтезу гамма-интерферона спленоцитами иммунных мышей (рисунок 40).

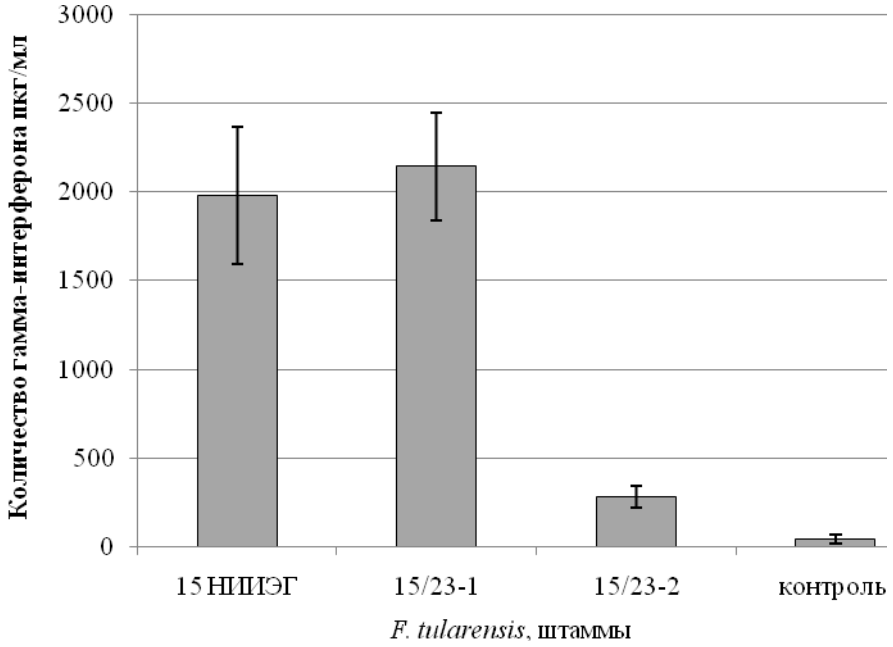


Рисунок 40 – Влияние инактивации гена *iglC* в штамме *F. tularensis* 15НИИЭГ на формирование клеточного иммунитета (30 сутки после иммунизации).

Примечание: Доза иммунизации для штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1 – 1×10^2 м.к./мышь, для штамма 15/23-2 – 1×10^5 м.к./мышь. Клеточный иммунитет оценивали по индуцированному синтезу гамма-интерферона спленоцитами иммунизированных мышей

Согласно приведенным данным, уровень синтеза гамма-интерферона был значительно выше у мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1 (5-8 раз), чем в группе, иммунизированной штаммом *F. tularensis* 15/23-2 (рисунок 40). Это свидетельствует, что иммунизация штаммом с делецией одной копии гена *iglC* приводит к формированию клеточного иммунитета, сравнимого по напряженности с клеточным иммунитетом, который формируется при вакцинации исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В то же время, иммунизация штаммом с делецией двух копий гена *iglC* приводит к формированию менее выраженного клеточно-опосредованного иммунного ответа.

Анализ полученных данных свидетельствует, что инактивация одной копии гена *iglC* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ не снижает иммуногенности существующего штамма и вызывает формирование клеточного и гуморального иммунитета, сравнимых с иммунитетом, индуцируемым исходным вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В то же время, иммунизация штаммом с делециями двух копий гена *iglC* приводит к меньшей выраженности клеточно-опосредованного иммунного ответа, т.е. этот штамм менее иммуногенен.

4.4 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на иммунобиологические свойства вакцинного туляремийного штамма

Одним из существенных недостатков существующей туляремийной вакцины является ее способность к диссоциации, обусловленной ее нестабильностью [19]. Поэтому создание штаммов, стабильно наследующих заявленные свойства, является актуальной проблемой при разработке новых вакцинных туляремийных штаммов.

Одним из механизмов генетической изменчивости микроорганизмов является рекомбинация ДНК. В данном процессе задействовано множество генов, в том числе, процесс гомологичной рекомбинации регулируется системой генов *recABCD*, в частности, генами *recA* и *recD*. Показано, что ген *recA* необходим в

ряде биологических процессов, включающих не только рекомбинационный механизм, но также репарацию ДНК, SOS-мутагенез и клеточное деление [296]. Еще одним важным геном системы рекомбинации является ген *recD*, продукт которого входит в состав мультиферментного комплекса RecBCD экзонуклеазы V и обладает АТФ-азной и хеликазной активностями. Показано, что инактивация генов рекомбинации приводит к стабилизации свойств, снижению как остаточной вирулентности для экспериментальных животных, так и способности к размножению в макрофагах [132, 295, 296].

4.4.1 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на культурально-морфологические свойства и чувствительность к нормальной кроличьей сыворотке штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

При выращивании на плотной питательной среде FTA штаммов с делетированными генами *recA* и *recD* были отмечены различия в динамике роста бактерий и в размере сформированных колоний. Штамм *F. tularensis* 15Δ*recA* не отличался от исходного штамма ни по размеру колоний, ни по времени их появления. Единичные колонии штамма *F. tularensis* 15Δ*recD* вырастали на FT агаре через 96-120 ч в отличие от штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15Δ*recA*, для которых время появления сформировавшихся колоний не превышало 72 ч. Колонии штамма 15Δ*recD* были более мелкими и не вырастали до размера колоний исходного штамма и штамма 15Δ*recA* (рисунок 41). По морфологии клетки мутантных и исходного штаммов не отличались друг от друга.

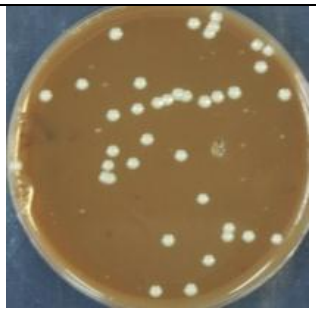
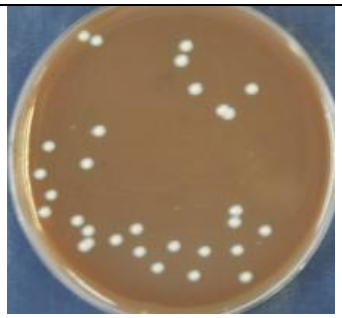
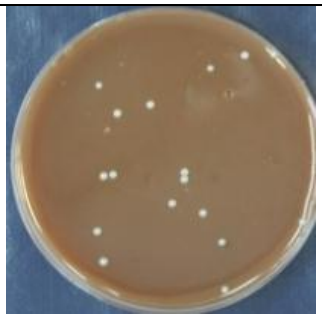
Морфология колоний			
штаммы *F. tularensis*	15 НИИЭГ	15Δ*recA*	15Δ*recD*

Рисунок 41 – Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на морфологию колоний *F. tularensis*.

Примечание: Морфология колоний штаммов *F. tularensis* на твердой питательной среде FTA через 72 ч.

Рост в жидкой питательной среде FTB оценивали по величине оптической плотности суспензии при длине волны 595 нм. Данные по величинам ОП (оптическая плотность) растущих культур приведены на рисунках 43 и 44. Динамика роста штамма *F. tularensis* 15Δ*recA* в жидкой питательной среде отличалась незначительно от исходного штамма на 3-5 ч культивирования, время ее удвоения равнялось двум часам, в отличие от штамма *F. tularensis* 15Δ*recD,* у которого динамика роста была снижена по сравнению с исходным штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ (рисунок 42).

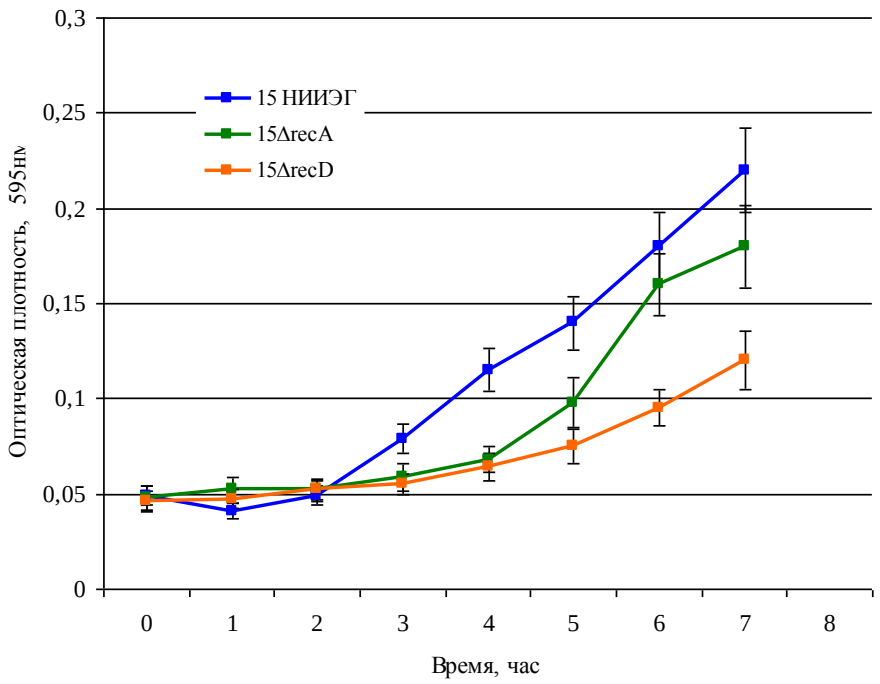


Рисунок 42 – Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на динамику роста *F. tularensis* в жидкой питательной среде

Было показано, что комплементация штамма *F. tularensis* 15Δ*recD* путем введения плазмиды pHV33-mob/*recD* восстанавливает культурально-морфологические свойства штамма *F. tularensis* 15Δ*recD*(pHV33-mob/*recD*), характерные для культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ: размер колоний и динамика роста приблизились к параметрам родительского штамма уже через 5 ч культивирования (рисунок 43).

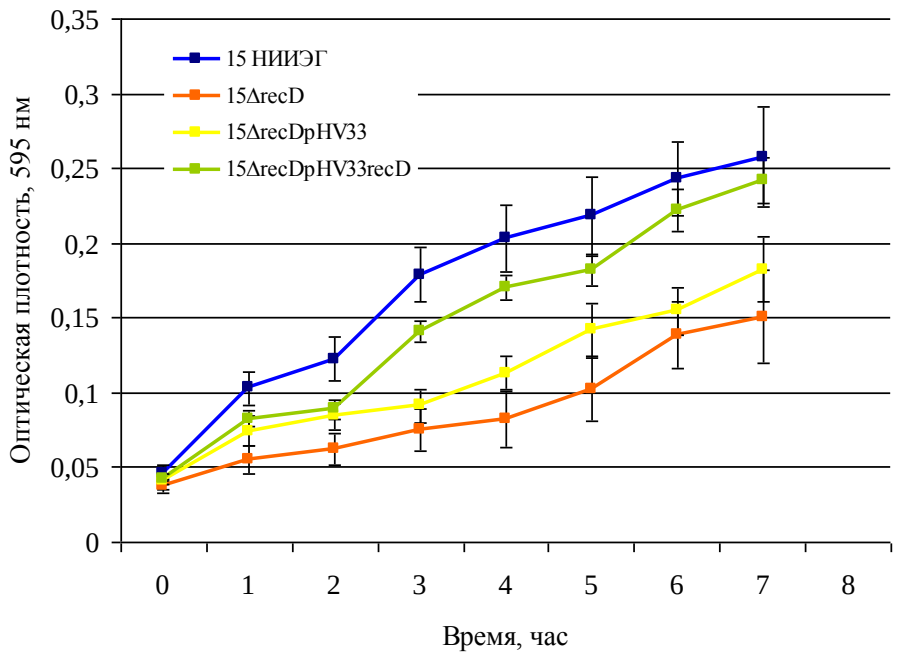


Рисунок 43 – Динамика роста штаммов *F. tularensis* 15, *F. tularensis* 15Δ*recD*, *F. tularensis* 15Δ*recD*(pHV33-mob), и *F. tularensis* 15Δ*recD*(pHV33-mob/*recD*) в жидкой среде

Представленные результаты свидетельствуют, что мутация в гене *recA* несущественно затрагивает клеточные процессы, влияющие на рост микроорганизма, а мутация в гене *recD* снижает способность штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ к росту как в жидкой, так и на твердой питательной среде (рисунок 41, 42).

Кроме того, инактивация генов системы рекомбинации *recA* и *recD* не повлияла на способность штаммов *F. tularensis* 15Δ*recA* и 15Δ*recD* сохранять жизнеспособность в НКС по сравнению с родительским штаммом. Было показано, что инкубация штаммов в НКС в течение 18 ч при температуре 37 ºС незначительно снижала (10-15 %) выживаемость штаммов *F. tularensis* 15Δ*recA* и *F. tularensis* 15Δ*recD* по сравнению с исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, свидетельствуя об их устойчивости к бактерицидному действию НКС (данные не приведены).

4.4.2 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на устойчивость штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ к ультрафиолетовому облучению и воздействию перекиси водорода

УФ-облучение является одним из факторов повреждения ДНК. RecA белок является одним из звеньев SOS-репарации, индуцируя систему репарации ДНК. Результаты высева УФ-облученных клеток *F. tularensis* 15/10Δ*recA* приведены в таблице 35. Для сравнения в этой таблице приведены данные по выживаемости штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15Δ*recA*(pHV33-mob/*rec*A), *F. tularensis* 15Δ*rec*A(pHV33-mob).

Таблица 35 – Влияние гена *recA* на устойчивость к УФ-облучению вакцинного туляремийного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Время экспозиции, с	Концентрация живых клеток после УФ-облучения (Lg КОЕ/мл)			
	F. tularensis 15НИИЭГ	*F. tularensis* 15Δ*recA*	*F. tularensis* 15Δ*recA* (pHV33-mob/*rec*A)	*F. tularensis* 15Δ*recA* (pHV33-mob)
0	9,14±0,6	9,30±0,6	8,91±0,6	9,20±0,6
10	9,04±0,6	7,00±0,5	8,81±0,6	7,01±0,5
20	9,01±0,5	6,60±0,4	8,47±0,6	6,02±0,4
40	8,70±0,4	6,25±0,5	8,37±0,4	5,36±0,5
80	8,00±0,4	5,00±0,4	8,16±0,5	4,47±0,4
160	6,90±0,4	-	7,51±0,4	-

Данные, приведенные в таблице, свидетельствуют, что инактивация гена *recA* приводит к повышению чувствительности бактериальных клеток штамма *F. tularensis* 15Δ*recA* к УФ-облучению. Экспозиция 10 с снижает количество жизнеспособных клеток на два порядка, а облучение в течение 160 с приводит к полной потере жизнеспособности. Введение плазмиды pHV33-mob/*recA*, комплементирующей ген *recA*, в штамм с делетированным геном *recA* приводит к восстановлению устойчивости к УФ-облучению, при этом сама плазмида pHV33-mob это свойство не восстанавливает (таблица 35).

Показано также, что удаление гена *recD* из генома вакцинного штамма 15 НИИЭГ не влияет на устойчивость штамма *F. tularensis* 15Δ*recD* к ультрафиолетовому облучению, поскольку у него сохраняются свойства исходного штамма (данные не приведены).

Еще одним свойством, важным для внутриклеточных патогенов, является устойчивость повреждающему действию активных форм свободных кислородных радикалов. Это свойство позволяет бактериям переживать внутри фагоцитирующих клеток, поскольку кислородные радикалы являются одним из факторов, обуславливающих бактерицидный эффект фагоцитов.

При сравнении чувствительности штаммов с делециями генов *recA* и *recD* к бактерицидному действию перекиси водорода (H_2O_2) было показано, что это свойство остается неизменным. При оценке чувствительности штаммов *F. tularensis* к воздействию перекиси водорода с помощью диско-диффузионного метода было показано, что 1 % содержание H_2O_2 на диске дает подавление зоны роста не более 0,9 см как для исходного штамма, так и для штаммов с делециями генов *recA* и *recD*, что говорит о сохранении устойчивости полученных штаммов к воздействию перекисных соединений. Таким образом, инактивация генов *recA* и *recD* не влияет на устойчивость полученных штаммов к действию H_2O_2.

4.4.3 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на способность к фагоцитозу и приживаемости в организме мышей линии BALB/c

Как было отмечено ранее, важной характеристикой создаваемых штаммов с инактивацией определенных генов является оценка их способности к выживанию и размножению в макрофагах и приживаемости в организме мышей.

Изучение влияния генов *recA* и *recD* на способность к фагоцитозу проводили на модели мышиных макрофагоподобных клеток J774.1A. Данные, полученные по высевам из макрофагов, инфицированных исходным и рекомбинантными штаммами *F. tularensis* 15Δ*recA* и 15Δ*recD* через 3, 24 и 48 ч, приведены на рисунке 44.

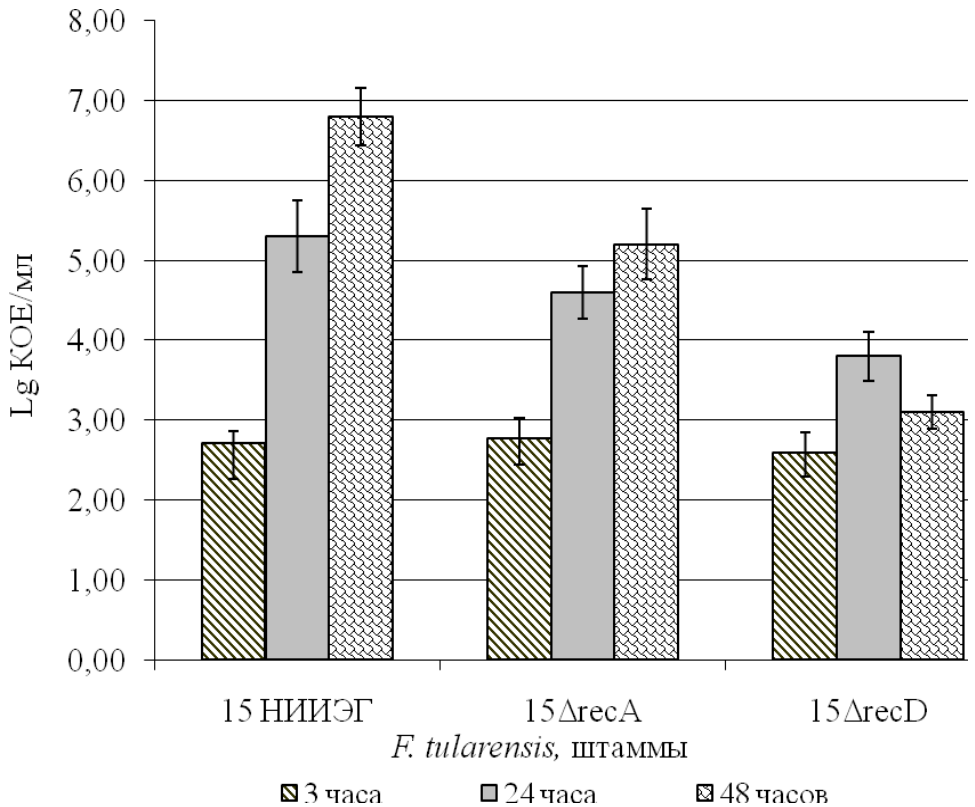


Рисунок 44 – Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD F. tularensis* на процесс фагоцитоза на модели макрофагоподобных клеток линии J774.1A.
Примечание: Макрофаги инфицировались в соотношении 100:1, количество бактерий в макрофагах определялось через 3, 24 и 48 ч после инфицирования; результаты показаны, как значение Lg КОЕ/мл ± доверительный интервал ($p<0,05$) по результатам трех независимых экспериментов.

В ходе исследований было обнаружено, что вакцинный штамм с инактивированным геном *recA* размножался в фагоцитах хуже, чем исходный штамм. Штамм *F. tularensis* 15Δ*recD* сохранял сниженную способность к размножению в течение 24 ч, но к 48 ч количество микробных клеток в лизате макрофагов достоверно снижалось ($p<0,05$), что свидетельствует о меньшей устойчивости к фагоцитозу по с равнению с исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и штаммом с инактивированным геном *recA* (рисунок 44). Это позволяет предположить, что инактивация гена *recD* имеет большее значение для изменения способности бактерий размножаться в фагоцитах, чем инактивация гена *recA*.

Приживаемость штаммов *F. tularensis* с инактивированными генами системы рекомбинации *recA* и *recD* оценивали по степени обсемененности

селезенки на 4, 7, 14 и 21 сут после инфицирования, используя мышей линии BALB/c (рисунок 45).

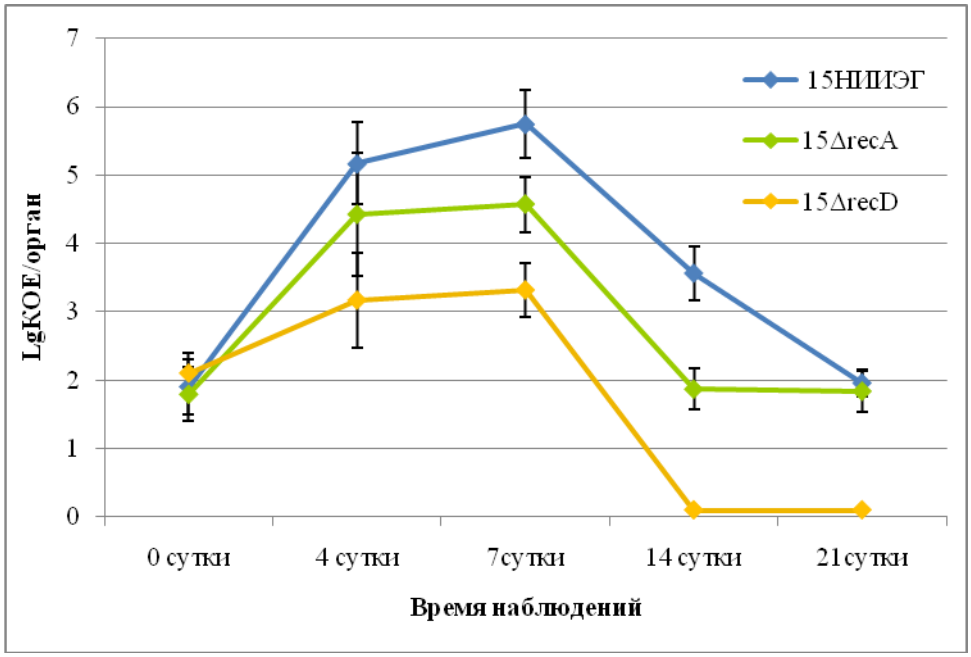


Рисунок 45 – Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на способность к персистенции *F. tularensis* в организме мышей линии BALB/c

Примечание: Доза иммунизации - 50 м.к./мышь. Результаты показаны, как значение Lg КОЕ/орган с доверительным интервалом (p <0,05).

Динамика высеваемости изучаемых штаммов из селезенки свидетельствует, что инактивация генов *recA* и *recD* снижает их способность персистировать в организме мышей. При одинаковой заражающей дозе на 4 сут между исходным штаммом и штаммом *F. tularensis* 15Δ*recA* нет достоверных различий в количестве высеваемых бактерий. Количество высеваемых бактерий из селезенок мышей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15Δ*recD,* достоверно ниже исходного штамма. На 7 и 14 сут эти различия становятся достоверными для всех штаммов, причем штамм *F. tularensis* 15Δ*recD* уже к 14 сут практически не высевается из селезенки, в отличие от родительского штамма и штамма *F. tularensis* 15Δ*recA*. На 21 сутки высеваемость из селезенки как для штамма *F. tularensis* 15Δ*recA*, так и для штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ не превышает 100 КОЕ (рисунок 45).

Таким образом, размножение рекомбинантных штаммов *F. tularensis* в мышиных макрофагах J774.1A коррелирут с приживаемостью этих штаммов в организме мышей линии BALB/c. Штамм *F. tularensis* 15Δ*recA* менее отличается по изученным свойствам от исходного вакцинного штамма, имеет лучшую способность к размножению в макрофагоподобных клетках и способен лучше приживаться в организме мышей, поскольку выделялся из селезенок зараженных животных, как и родительский штамм, вплоть до 21 суток.

4.4.4 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на степень остаточной вирулентности и протективные свойства

Определение остаточной вирулентности штаммов с инактивированными генами *recA* и *recD* проводили в соответствии с МУ 3.3.1.2161-07, заражая мышей линии BALB/c подкожно соответствующими рекомбинантными штаммами в различном диапазоне доз. Для штамма *F. tularensis* 15Δ*recA* диапазон доз составлял 10-10^5 м.к./мышь, а для штамма *F. tularensis* 15Δ*recD,* учитывая результаты, полученные на клеточной линии J774.1A, диапазон доз был увеличен до 10^9 м.к./мышь.

Защитные свойства штаммов оценивали по выживаемости мышей после их заражения бактериями *F. tularensis* 503 в дозе 1×10^3 КОЕ/мышь (1000 DCL) (таблица 36).

Таблица 36 – Влияние инактивации генов системы рекомбинации *recA* и *recD* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на вирулентность и протективность для мышей линии BALB/c

Штаммы *F. tularensis*	LD_{50}, м.к.	ED_{50}, м.к.
15НИИЭГ	79,0 (40÷110)	8,5 (1,8÷53,7)
15Δ*recA*	$5{,}0\times10^3$($1{,}99\times10^3$÷$7{,}94\times10^4$)	15,5 (7,8÷73,1)
15Δ*recD*	$5{,}0\times10^8$ ($2{,}51\times10^8$÷$3{,}16\times10^9$)	915,3 (574,1÷1303,1)

Согласно приведенным данным, мутации в генах *recA* и *recD* позволили получить штаммы *F. tularensis* с разной степенью аттенуации. У штамма 15Δ*recA*

остаточная вирулентность снизилась почти на два порядка, а у штамма 15Δ*recD* почти на шесть порядков (таблица 36). Протективные свойства штамма *F. tularensis* 15ΔrecA были сохранены практически на уровне родительского штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Для штамма *F. tularensis* 15ΔrecD величина ED_{50} была на два порядка выше, чем у исходного штамма, тем не менее, он сохранял защитные свойства.

4.4.5 Влияние генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на реактогенные свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (по изменению веса и гематологическим показателям мышей линии BALB/c)

Изучение влияния генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на реактогенные свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ проводили по той же схеме, что и оценивали влияние гена *iglC*, т.е. изучали динамику изменения веса и гематологические показатели мышей линии BALB/c. Наблюдения за изменением веса у мышей проводили в течение 10 суток, результаты приведены на рисунке 46.

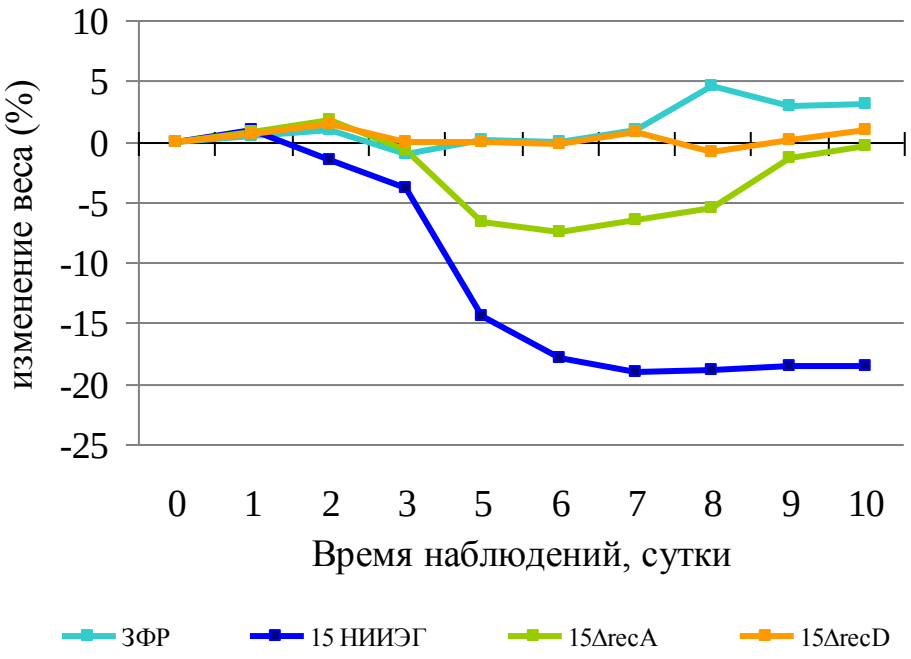


Рисунок 46 – Динамика изменения веса мышей линии BALB/c по отношению к первому дню иммунизации (%) после вакцинации штаммами *F. tularensis* с инактивированными генами *recA* и *recD*.

Примечание: Доза иммунизации для всех штаммов – 1×10^2 м.к./мышь

Результаты, полученные для штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, были практически идентичны результатам, полученным при исследовании его в качестве штамма сравнения при изучении штаммов с делециями гена *iglC*. У мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15Δ*recA*, падение веса не превышало 7,5 %, и наблюдали его на 5-7 сутки. К 9-ым суткам вес мышей в этой группе возвращался практически к исходным значениям. У мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15Δ*recD*, колебания веса соответствовали колебаниям веса не иммунизированной группы.

Сравнение влияния иммунизации штаммами с делециями генов системы рекомбинации *recA* и *recD* на гематологические показатели мышей показало, что количество эритроцитов и уровень гемоглобина остаются в пределах нормальных значений (гемоглобин –(102÷128) г/л, количество эритроцитов – (7,37÷9,42)×10 ^{12}/л).

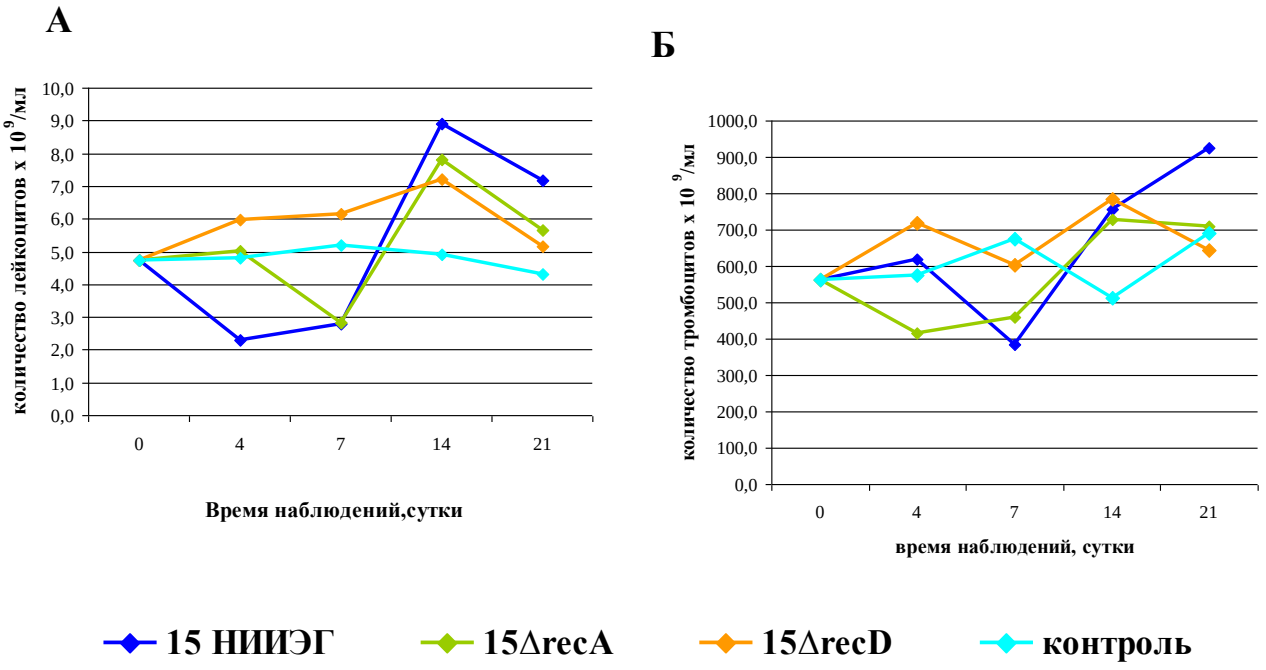


Рисунок 47 – Изменение количества лейкоцитов (А) и тромбоцитов (Б) мышей линии BALB/c после вакцинации штаммами *F. tularensis* с инактивированными генами *recA* и *recD*.

Примечание: Доза иммунизации для всех штаммов – 1×10^{2} м.к./мышь.

Как и при изучении штаммов с делециями гена *iglC*, наиболее интересные данные при иммунизации штаммами *F. tularensis* 15Δ*recA* и 15Δ*recD* были

получены при исследовании динамики изменения количества лейкоцитов и тромбоцитов (рисунок 47 А, Б).

Наши исследования показали, что иммунизация штаммом *F. tularensis* 15Δ*recA* у мышей выывает развитие лейкопении на 7 сут, которая сменяется лейкоцитозом на 14 сут; к 21 сут количество лейкоцитов возвращалось к нормальным значениям. Иммунизация штаммом *F. tularensis* 15Δ*recD* вызывала незначительный лейкоцитоз на 14 сут (рисунок 47 А). Изменения этого показателя у мышей, иммунизированных родительским штаммом, носили более выраженный характер. Те же тенденции наблюдали и при исследовании количества тромбоцитов в крови иммунизированных животных – тромбоцитопения сменялась тромбоцитозом, причем изменения этого показателя были менее выражены при иммунизации штаммом *F. tularensis* 15Δ*recD*, наиболее выражены при вакцинации родительским штаммом, а штамм *F. tularensis* 15Δ*recA* занимал промежуточное положение (рисунок 47 Б).

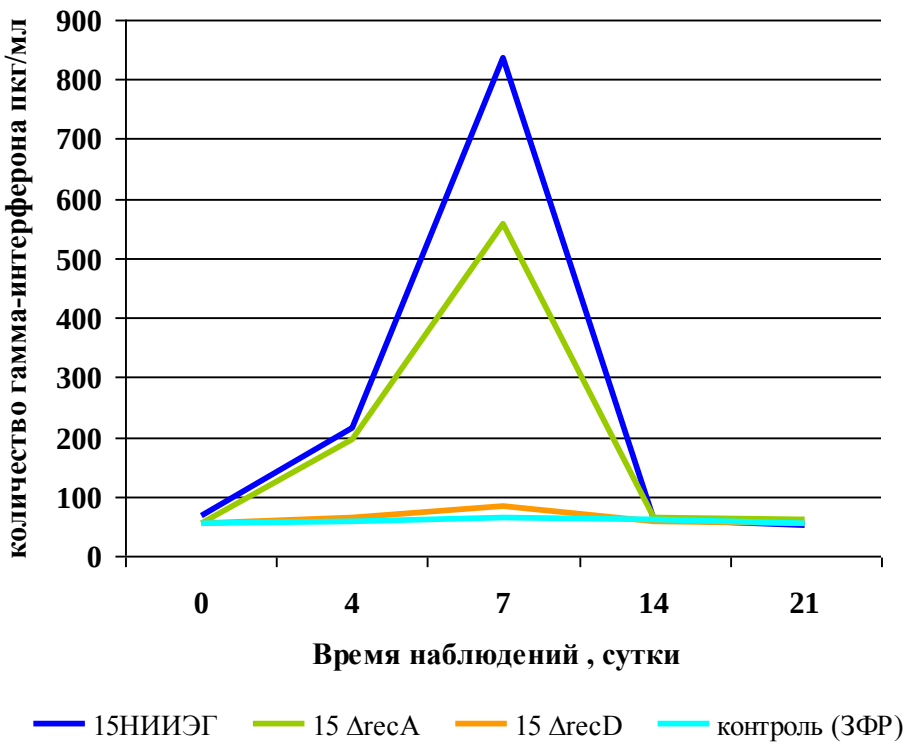


Рисунок 48 – Изменение уровня гамма-интерферона в сыворотке крови мышей линии BALB/c после вакцинации штаммами *F. tularensis* с инактивированными генами *recA* и *recD*.

Примечание: Доза иммунизации для всех штаммов – 1×10^2 м.к./мышь

Повышение уровня гамма-интерферона в сыворотках регистрировали на 7 сут после иммунизации, как и при изучении влияния делеции гена *iglC* на реактогенные свойства штамма, причем инактивация гена *recD* практически не вызывала повышения уровня гамма-интерферона в сыворотке (рисунок 48), в то время как иммунизации исходным вакцинным штаммом и штаммом *F. tularensis* 15Δ*recA* вызывала значительное повышение уровня этого цитокина.

Суммируя вышесказанное, можно сказать, что в этой части наших исследований мы показали, что гены *recA* и *recD*, входящие в систему генов гомологичной рекомбинации *recABCD,* по-разному влияют на реактогенные свойства штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Инактивация гена *recD* значительно снижает реактогенные свойства штамма, так как иммунизация этим штаммом не вызывает снижения веса животных, а изменения гематологических показателей носят минимальный характер. Напротив, инактивация гена *recA* незначительно повлияла на реактогенные свойства вакцинного штамма, поскольку он вызывал те же изменения, что и исходный вакцинный штамм, хотя степень их выраженности была несколько снижена.

Следует еще раз отметить, что выявленные изменения (гематологические показатели, уровень гамма-интерферона в сыворотке крови мышей и изменение веса животных), вызванные иммунизацией штаммами с целенаправленными мутациями, как и в случае с мутантными штаммами по гену *iglC,* могут служить критериями оценки реактогенности туляремийных штаммов.

4.4.6 Оценка влияния генов системы рекомбинации *recA* и *recD* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на формирование гуморального и клеточного иммуннитета при иммунизации мышей линии BALB/c

Определение титров антител к суммарному туляремийному антигену (УЗД-лизат *F. tularensis*) проводили на 21 сут после вакцинации мышей родительским штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и штаммами с делецией генов *recA* и *recD*. Полученные данные представлены в таблице 37.

Таблица 37 – Влияние инактивации генов *recA* и *recD* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на формирование гуморального иммунитета у мышей линии BALB/c

F. tularensis штаммы	Доза вакцинации, м.к./мышь	Средние значения титров антител к УЗД *F. tularensis* (пределы колебаний)
15НИИЭГ	10^2	1/400 (1/200÷1/800)
15Δ*recA*	10^2	1/400 (1/200÷1/800)
15Δ*recD*	10^2	1/200 (1/100÷1/400)
	10^5	1/400 (1/200÷1/800)

Иммунизирующая доза 10^2 м.к. для штамма *F. tularensis* 15Δ*recA* была достаточна для индуцирования выработки специфических антител в тех же титрах, что и иммунизация родительским штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ (таблица 37). Для штамма *F. tularensis* 15Δ*recD* при дозе иммунизации 10^2 м.к. титр специфических антител был ниже, и только иммунизация более высокой дозой (10^5 м.к.) позволила повысить титр антител.

Клеточное звено иммунитета у мышей оценивали по индуцированному УЗД *F. tularensis* синтезу гамма-интерферона спленоцитами (рисунок 49).

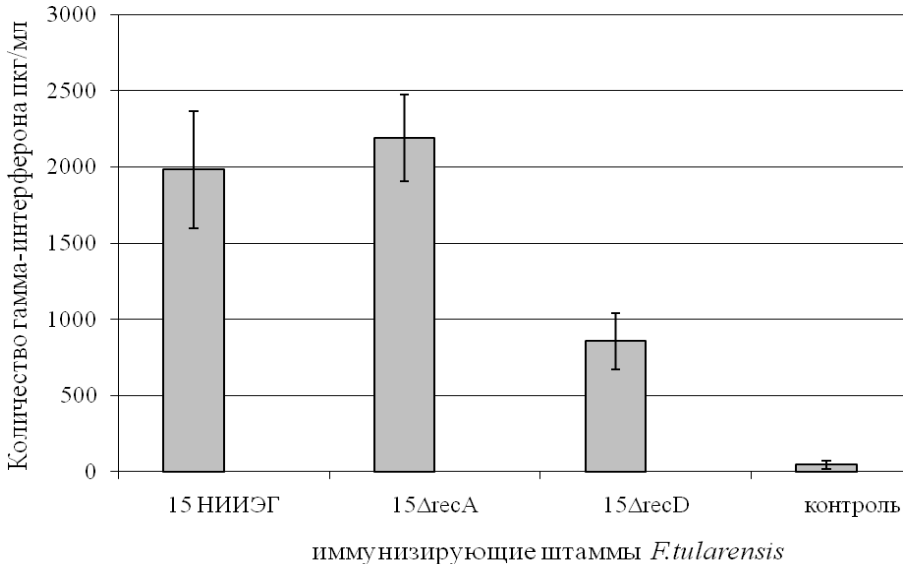


Рисунок 49 – Влияние инактивации генов системы рекомбинации *recA* и *recD* *F. tularensis* 15 НИИЭГ на формирование клеточного иммунитета (30 сут после иммунизации)

Примечание: Доза иммунизации для штаммов 15 НИИЭГ и 15Δ*recA* – 1×10^2 м.к./мышь, для штамма 15Δ*recD* – 1×10^5 м.к./мышь. Клеточный иммунитет оценивали по индуцированному синтезу гамма-интерферона спленоцитами иммунизированных мышей

Показано, что во всех группах иммунизированных животных уровень синтеза гамма-интерферона был достоверно выше, чем у не иммунных животных. В то же время следует отметить, что у мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15Δ*recD*, уровень синтеза этого цитокина был достоверно ниже, чем в группах, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15Δ*recA* (рисунок 49). Это позволяет считать, что иммунизация штаммом с делецией гена *recA* не изменяет свойств исходного штамма 15 НИИЭГ и приводит к формированию напряженного клеточного иммунитета.

4.5 Влияние генов *bla* на иммунобиологические свойства вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Как указывалось в 4 главе, наличие β-лактамазной активности используется как диагностический признак при определении подвидовой принадлежности туляремийного микроба, так как, согласно данным Н.Г.Олсуфьева [55], у *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* лактамазная активность отсутствует. Мы предположили, что различия в β-лактамазной активности у штаммов различных подвидов могут быть обусловлены такими причинами, как различие спектра β-лактамаз, различия в последовательности гомологичных белков, или же расположении кодирующих их генов, что может влиять на уровень экспрессии фермента. Анализ разнообразия генов β-лактамаз в геномах штаммов *F. tularensis in silico* показал, что *F. tularensis* имеет 4 белка с установленной или предполагаемой β-лактамазной активностью, обозначенные нами *bla1, bla2, bla3* и *ars* (таблица 22, глава 3).

Для изучения роли β-лактамаз в обеспечении устойчивости возбудителя туляремии к β-лактамным антибиотикам мы попытались последовательно инактивировать кодирующих их гены в штамме *F. tularensis* subsp.*holarctica* 15 НИИЭГ. Нами были получены штаммы с инактивированными генами *bla1, bla2, bla3* и с одновременно тремя инактивированными генами *bla123* (глава 3). Проведение генетических манипуляций с геномом нередко приводит к ослаблению жизнеспособности мутантных штаммов, связанных с

неидентифицированными мутациями, неучтенным влиянием инактивированного фермента на метаболизм и нарушением систем регуляции экспрессии других белков, в этой связи мы изучали основные биологические свойства полученных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ с инактивированными генами *bla*.

4.5.1 Изучение чувствительности *F. tularensis* к антибиотикам класса β-лактамов

Целью создания штаммов *F. tularensis* с мутациями по генам *bla1, bla2, bla3 и bla123* было изучение различий в β-лактамазной активности у штаммов различных подвидов, которые, по нашим предположениям, могут быть обусловлены как различием спектра β-лактамаз, так и различиями в последовательности гомологичных белков или же расположением кодирующих их генов, влияющим на уровень экспрессии фермента. Для оптимизации оценки антибиотикочувствительности мутантных штаммов одним из этапов нашей работы было изучение чувствительности к антибиотикам группы бета-лактамов штаммов *F. tularensis* разных штаммов *F. tularensis* разных подвидов при различных условиях. В наших исследованиях мы использовали как дискодиффузионный метод, так и метод серийных разведений.

4.5.1.1 Сравнение чувствительности к β-лактамам штаммов *F. tularensis* в зависимости от подвидовой принадлежности

Ранее было показано [368], что штаммы туляремийного микроба среднеазиатского подвида, в отличие от subsps *tularensis* и *holarctica,* не обладают пенициллазной активностью, определяемой в тесте с феноловым красным или нитроцефином, хотя и имеют в своем геноме ген сериновой лактамазы FTU-1, ответственной за устойчивость к пенициллинам [109]. В то же время, в недавних исследованиях было обнаружено, что штаммы *F. tularensis* разных подвидов высоко резистентны к бета-лактамным антибиотикам в дискодиффузионном тесте вне зависимости от их подвидовой принадлежности и активности пенициллиназы в тесте с нитроцефином [95].

Чувствительность к бета-лактамным антибиотикам различных групп (пенициллинам, карбапенемам и цефалоспоринам) была определена у 12 штаммов *F. tularensis* различных подвидов диско-диффузионным методом. Результаты исследований представлены в таблице 38.

Таблица 38 - Чувствительность штаммов *F. tularensis* разных подвидов к антибиотикам группы бета-лактамов

Подвид	Штаммы *F. tularensis*	пенициллины		карбапенемы			цефалоспорины						
		Ампициллин	Амоксициллин/клавуланат	Меропенем	Имипенем	Эртапенем	Цефтазидим	Цефотаксим	Цефуроксим	Цефазолин	Цефтриаксон	Цефепим	Цефокситин
tularensis	Schu	0*	0	0	0	0	0	0	0	0.	0	21	0
holarctica	503	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0
	A-79	0	0	0	38	0	0	0	0	0	0	0	0
	X-3	0	0	11	26	28	37	0	0	0	0	0	11
	A-1045	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0
	15 НИИЭГ	10	10	25	30	30	25	30	20	0	28	25	25
mediasiatica	A-823	13	0	0	24	25	0	32	0	0	0	0	20
	A-554	0	0	0	18	11	0	30	0	0	0	0	30
	678	0	0	0	16	0	0	0	0	48	0	0	0
	120	0	0	0	18	15	0	0	0	0	0	0	0
	120Δpur	0	11	0	25	18	0	0	0	0	10	0	13
	Miura	0	0	0	14	45	0	28	22	0	0	0	27

Примечание: Данные представлены как диаметр зоны ингибирования (мм) микробного роста *F. tularensis* (включая диаметр диска - 6 мм). * - Диаметр 0 мм ставили без учета диаметра бумажного диска в случаях, когда зона задержки роста микроорганизма вокруг диска отсутствовала.

Из данных таблицы видно, что штаммы *F. tularensis* subsp *mediasiatica* ничем не отличались от штаммов других подвидов по уровню резистентности к β-лактамам. Полученные результаты согласуются с недавними исследованиями М. В. Цимбалистовой и Н.В. Павлович [95]. По уровню чувствительности к бета-лактамам наименее резистентным оказался вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ, что, вероятней всего, вызвано его аттенуацией и неполноценной капсулой.

Далее мы сравнили устойчивость к различным группам бета-лактамов штаммов *F. tularensis* подвидов *holarctica* 15 НИИЭГ и *mediasiatica* 120Δ*pur* методом стандартных разведений для определения МИК и МБК.

Чувствительность клеток *F. tularensis* к антибиотикам лактамного ряда оценивали, используя микробную взвесь в стандартной концентрации 10^8 м.к./мл. Туляремийный микроб обладает природной устойчивостью к бета-лактамам, поэтому при данном методическом подходе мы не смогли установить величину МИК, поскольку она значительно превышала использованный нами диапазон концентраций ампициллина – от 1 до 2048 мг/л. В связи с этим сравнение антибиотикорезистентности обоих штаммов проводили по проценту снижения жизнеспособности микробной суспензии в присутствии различных доз антибиотика (таблица 39).

Таблица 39 - Чувствительность штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 120Δ*pur* к антибиотикам группы бета-лактамов (10^8 КОЕ/мл)

Название а/б	Штаммы *F. tularensis*	Концентрация антибиотика, мкг/мл				
		2048	512	128	32	8
ампициллин	15 НИИЭГ	41,5±4,6*	39,6±8,2	48,4±3,8	63,7±6,6	78,2±7,9
	120Δpur	68,8±7,2	75,4±4,2	79,9±8,4	78,8±5,9	82,6±7,4
амоксициллин	15 НИИЭГ	44,5±5,6	39,6±5,7	44,4±5,1	56,7±7,9	72,2±8,9
	120Δpur	74,8±2,4	78,6±3,9	77,9±1,3	69,0±0,7	73,0±3,4
меропенем	15 НИИЭГ	42,4±5,9	34,9±4,7	39,1±2,9	41,4±5,5	36,4±15,6
	120Δpur	77,6±5,9	75,8±4,7	77,0±4,8	74,5±12,8	73,4±4,6
цефазолин	15 НИИЭГ	40,6±9,0	45,2±8,7	44,3±4,2	42,0±4,7	44,0±3,8
	120Δpur	68,0±1,2	67,7±7,0	71,9±0,3	74,0±3,4	75,4±8,2
цефалотин	15 НИИЭГ	27,2±3,5	29,2±2,2	35,7±3,4	70,7±5,5	86,7±4,3
	120Δpur	47,6±4,1	81,9±18,6	95,7±1,0	94,7±4,6	99,0±13,9
цефотаксим	15 НИИЭГ	32,9±9,0	32,7±1,7	39,2±5,3	39,2±3,0	37,9±5,6
	120Δpur	55,7±5,0	65,5±0,6	69,7±0,4	72,9±1,9	63,5±1,4
цефтазидин	15 НИИЭГ	44,3±5,5	44,4±6,4	44,9±8,6	48,5±3,4	57,3±6,2
	120Δpur	71,6±1,9	80,9±4,3	81,9±0,4	75,1±4,9	77,6±4,3
цетриаксон	15 НИИЭГ	10,0±13,2	44,6±8,9	54,4±4,3	71,2±4,8	92,1±3,9
	120Δpur	12,7±1,2	77,8±7,1	97,5±0,4	103,0±3,5	100,2±8,4

Примечание: * Жизнеспособность представлена как процент живых клеток *F. tularensis* по сравнению с контрольной суспензией. Количество живых клеток определяли в тесте МТТ спектрофотометрически при длине волны 595 нм. В таблице приведены данные трех независимых экспериментов

Таким образом, было установлено, что при концентрации микробной взвеси 10^8 м.к./мл бактериальные клетки штамма *F. tularensis*120Δ*pur* среднеазиатского подвида не только не уступают в резистентности штамму голарктического подвида *F. tularensis* 15 НИИЭГ, но даже демонстрируют более выраженную устойчивость к бактерицидному действию всех использованных антибиотиков (таблица 39).

Чтобы определить концентрацию микробной взвеси *F. tularensis*, позволяющую оценить МИК и МБК ампициллина, мы титровали микробную суспензию десятикратными разведениями в диапазоне концентраций ампициллина от 1 до 2048 мг/л. В результате было выяснено, что величину МИК и МБК можно установить только при концентрации микробной взвеси не более 10^6 КОЕ/мл (таблица 40).

Таблица 40 – Чувствительность штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 120Δ*pur* к ампициллину. Величины МИК и МБК определены методом стандартных разведений при различных концентрациях микробной взвеси

Концентрация по стандарту мутности 5 ед, м.к./мл	МИК, мкг/мл (диапазон)*		МБК, мкг/мл (диапазон) *	
	15 НИИЭГ	120Δ*pur*	15 НИИЭГ	120Δ*pur*
10^8	>2048	>2048	>2048	>2048
10^7	>2048	>2048	>2048	>2048
10^6	512-2048	4	>2048	8
10^5	128-256	2	256-1024	2
10^4	32	0	32	0
10^3	2	0	2	0

Примечание: * Представлены пограничные значения полученного диапазона МИК и МБК в двух независимых экспериментах, каждая проба в каждом эксперименте была поставлена в трех повторах.

Было обнаружено, что только при снижении концентрация микробной взвеси до 10^6 м.к./мл, штамм *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 120Δ*pur* демонстрировал значительное повышение чувствительности к ампициллину по сравнению со штаммом *F. tularensis* subsp.*holarctica* 15 НИИЭГ, что объясняет показанную ранее его низкую лактамазную активность. При повышении

концентрации микробных клеток штамм демонстрировал высокую устойчивость к антибиотику.

Используя микробную взвесь в концентрации 10^5 м.к./мл, мы определили МИК и МБК туляремийного микроба к β-лактамам разных структурных групп (пенициллинам, карбапенемам и цефалоспоринам) и установили, что штамм *F. tularensis* 120Δ*pur*, в отличие от штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, высокочувствителен ко всем антибиотикам группы пенициллинов (таблица 41). Концентрация, вызывавшая полную гибель клеток *F. tularensis* 120Δ*pur* для разных пенициллинов составила от 2 до 8 мг/л, в то время как для штамма 15 НИИЭГ МБК бактерицидные концентрации пенициллинов колебались в пределах от 32 до 1024 мг/л. В то же время следует отметить, что резистентность клеток *F. tularensis* 120Δ*pur* к цефазолину (цефалоспорин первого поколения) была в несколько раз выше, чем у штамма 15 НИИЭГ.

Таблица 41 – Чувствительность штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ subsp *holarctia* и 120Δ*pur* subsp *mediasiatica* к антибиотикам группы β-лактамов

Название а/б	МИК, мкг/мл (диапазон)*		МБК, мкг/мл (диапазон) *	
	15 НИИЭГ	120Δ*pur*	15 НИИЭГ	120Δ*pur*
ампициллин	128–256	2	256–1024	2
амоксициллин	128–256	4	512	4–8
пенициллин	16–32	4	32–64	4
цефазолин	16–32	256	64–128	256
цетриаксон	2	2	2–4	2
имипенем	4–8	4–8	32	16
меропенем	4	8–16	4	8–64

Примечание: * Представлены пограничные значения полученного диапазона МИК и МБК в двух независимых экспериментах, каждая проба в каждом эксперименте была поставлена в трех повторах.

Таким образом, было выявлено, что снижение концентрации микробных клеток *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 120Δ*pur* в исходной взвеси приводит к повышению его чувствительности к антибиотикам группы пенициллинов.

4.5.1.2 Определение чувствительности к антибиотикам штаммов *F. tularensis* с инактивированными генами β-лактамаз

Для оценки вклада отдельных лактамаз в способность *F. tularensis* инактивировать бета-лактамные антибиотики, мы изучили чувствительность к

различным группам бета-лактамов полученных нами мутантных вариантов штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ с инактивированными генами β-лактамаз.

Объектами исследования являлись штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ с делетированными генами β-лактамаз *bla*1, *bla*2 и *bla*3. В качестве референс-штамма использовали родительский штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В экспериментах использовали десять антибиотиков, принадлежащих к трем основным группам бета-лактамов – пенициллинам, цефалоспоринам и карбапенемам: пенициллин, ампициллин, карбоксициллин, амоксициллин, цефазолин, цефтазидин, цефтриаксон, цефалотин, имипенем и меропенем. Результаты определения антибиотикочувствительности по МИК и МБК представлены в таблице 42.

Как видно из приведенных в таблице данных, инактивация генов *bla*1 и *bla*3, как по отдельности, так и вместе, не влияла на чувствительность *F. tularensis* 15 НИИЭГ к бета-лактамам. Различие в чувствительности по сравнению с исходным родительским штаммом демонстрировали лишь два мутантных штамма – 15Δ*bla*2 и 15Δ*bla*123. Также нами было показано увеличение их чувствительности к ампициллину и амоксициллин-клавулонату при высеве на плотную питательную среду (рисунок 50).

Увеличения чувствительности к другим β-лактамным антибиотикам – цефалоспоринам и карбопенемам - не наблюдалось. несмотря на то, что продукт гена *bla2* был описан как карбапенемаза [109].

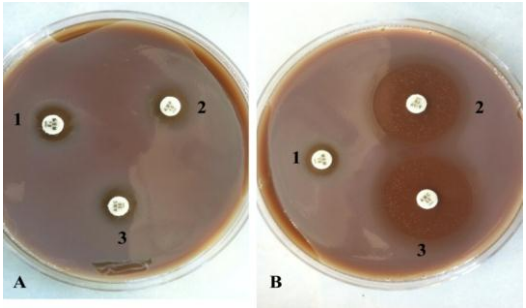


Рисунок 50 - Определение устойчивости к антибиотикам диск-диффузионным методом

Примечание: А - *F. tularensis* 15 НИИЭГ, В - *F. tularensis* 15 Δ*bla*2; 1- меропенем, 2- ампициллин, 3 – амоксициллин/клавуланат

Таблица 42 - Чувствительность штаммов *F. tularensis* 15НИИЭГ с инактивированными генами бета-лактамаз к бета-лактамным антибиотикам*

антибиотик	15НИИЭГ		15Δ*bla1*		15Δ*bla2*		15Δ*bla3*		15Δ*bla13*		15Δ*bla123*	
	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК
ампициллин	128-256	256-1024	128-256	256-512	8	16	64-256	256-512	64-256	256-1024	2	8
амоксициллин	128-256	512	128	512	8	8	128	256	128	512	4-8	4-8
пенициллин	16-32	32-64	16	32-64	2	4	16-32	64	16	32	2	4
карбоксициллин	32-64	64-128	32	64	4	8	16	64	8-32	32-64	4	4
имипенем	4-8	32	8	16-32	8-16	16	4-8	8	8-16	16	4-8	16
меропенем	4	4	8-32	2-4	32	4-16	4-16	2-16	4	16	2	2
цефтриаксон	2	4	2-32		4-64	2	2-4	4-8	4	8	2	4
цефазолин	64-128	512	16-32	128	32-64	128	32-64	256	32	128	32	32-64
цефтазидин	4-16	16-32	8	32	4-8	8-32	4-16	32	4-8	8-16	8	32
цефалотин	8	16-32	8	16-32	4	16	8	16	4	8	4-8	8-16

Примечание: *Представлены пограничные данные полученного диапазона значений МИК и МБК в трех независимых экспериментах, каждая проба в каждом эксперименте была поставлена в трех повторах

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было установлено, что чувствительность к бета-лактамам различных групп появлялась только у штаммов *F. tularensis* с инактивированной лактамазой Bla2 - *F. tularensis* 15Δ*bla*2 и 15Δ*bla*123. Инактивация гена *bla2* приводила к появлению чувствительности к антибиотикам группы пенициллинов, но не цефалоспоринов и карбапенемов. Инактивация двух других генов бета-лактамаз – *bla1* и *bla3* - не приводила к изменению чувствительности *F. tularensis* ко всем использованным в опыте антибиотикам лактамного ряда. Таким образом, наши результаты согласуются с результатами X.R. Bina [124] об отсутствии роли белка Bla3 в обеспечении устойчивости к β-лактамам, а также получены аналогичные результаты для белка Bla1, позиционированного в базе NCBI как металло-бета-лактамаза. Возможно, что каталитическая активность по отношению к β-лактамам ассоциирована с доменом, который после распада у голарктического подвида туляремийного микроба кодирующего его гена на две открытые рамки считывания экспрессируется независимо от *bla*1, и описан как арилсульфатаза. В связи с тем, что нам не удалось инактивировать ген *ars* ни путем его полной или частичной делеции, ни ведением в его последовательность стоп-кодонов, ни сдвигом его рамки считывания, оценить роль арилсульфатазы в антибиотикорезистентности на данный момент не представляется возможным.

4.5.1.3 Комплементация чувствительности к ампициллину плазмидами, несущими маркер ампициллин-резистентности

Приобретение чувствительности к аминопенициллинам могло бы позволить использовать штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГΔ*bla*2 и *F. tularensis* 15 НИИЭГΔ*bla*123 для генетических манипуляций и значительно расширить доступный арсенал генно-инженерных инструментов, пригодных для изучения туляремийного микроба. Для проверки этой возможности мы трансформировали штаммы *F. tularensis* 15Δ*bla*2 и *F. tularensis* 15Δ*bla*123 плазмидой pGm6, которая содержит маркер устойчивости к ампициллину, и оценили устойчивость к ампициллину исходных и трансформированных штаммов (таблица 43).

Таблица 43 – Восстановление устойчивости к ампицилину штаммов с делециями генов *bla* и *bla123* путем трансформации плазмидой pGm6 с маркером ампициллинустойчивости.*

Штаммы *F. tularensis*	КОЕ/мл в среде без антибиотика	КОЕ/мл в среде с ампициллином (1000 мкг/мл)
15 НИИЭГ	520,7±20,6	437,6±21,9
15Δ*bla2*	532,3±46,3	3,0±1,9
15Δ*bla123*	523,0±6,3	2,0±1,1
15Δ*bla2*-pGM6	517,0±14,4	701,3±35,1
15Δ*bla123*-pGM6	495,3±39,1	676,0±33,8

Примечание: *Суспензии *F. tularensis* в концентрации 5×10^2 кл/мл

Как видно из таблицы, при введении в клетки штаммов с делетированным геном *bla*2 плазмиды, содержащей маркер резистентности к ампициллину, устойчивость к данному антибиотику полностью восстанавливается. Таким образом, штаммы 15 Δ*bla*2 и 15 Δ*bla*123 могут использоваться вместо штамма 15 НИИЭГ в генно-инженерных экспериментах. Следует отметить, что число маркеров антибиотикоустойчивости, используемых как инструмент для генетических манипуляций с *F. tularensis,* на данный момент ограничено двумя - устойчивостью к хлорамфениколу и канамицину. Использование других антибиотиков в качестве маркеров запрещено международными и отечественными правилами, направленными на ограничение получения генетически измененных штаммов опасных инфекций с устойчивостью к антибиотикам, применяемым для лечения (например, к гентамицину). Поэтому использование штаммов 15Δ*bla*2 и 15Δ*bla*123 в генно-инженерных экспериментах расширяет спектр генетического инструментария, так как их чувствительность к ампициллину позволяет трансформировать их плазмидами, несущими маркер ампициллин-устойчивости.

4.5.1.4 Изучение сравнительной β-лактамазной активности *F. tularensis* subsps. *mediasiatica* и *holarctica* и штаммов *F. tularensis* 15Δ*bla*2 и *F. tularensis* 15Δ*bla*123

Как было нами показано, чувствительность подвида *mediasiatica,* в частности, штамма *F. tularensis* 120Δ*pur,* к бета-лактамным антибиотикам

проявляется при низкой (не более 10^6м.к./мл) концентрации микробных клеток во взвеси. Это позволило нам предположить, что наблюдаемое у штаммов среднеазиатского подвида отличие последовательности белка Bla2 по одной аминокислоте (замена в 97 положении глицина на аргинин) приводит к снижению эффективности реакции расщепления лактамного кольца.

Для проверки этого предположения нами была изучена почасовая динамика бета-лактамазной активности штаммов *F. tularensis* subsp *mediasiatica* 120Δ*pur* и *F. tularensis* subsp *holarctica* 15 НИИЭГ, а также его безлактамазных вариантов - *F. tularensis* 15Δ*bla*2 и *F. tularensis* 15Δ*bla*123.

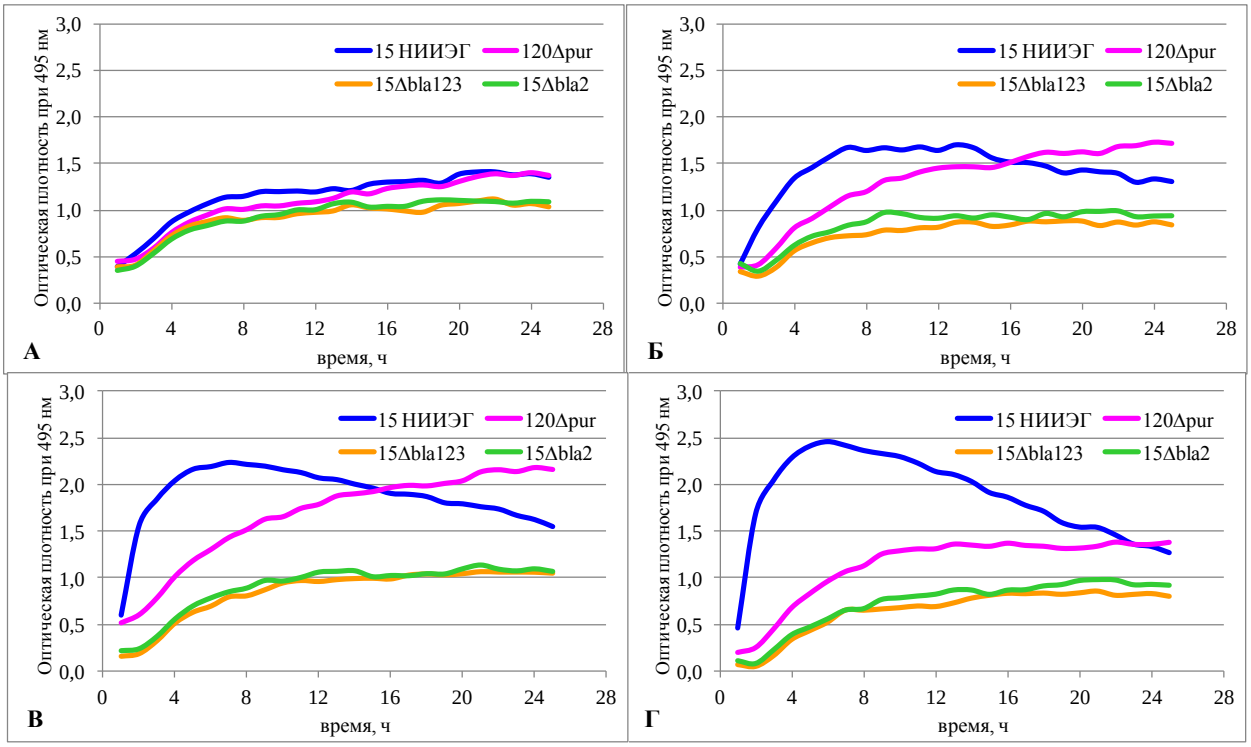


Рисунок 51 - Динамика расщепления нитроцефина клетками *F. tularensis* штаммов 15 НИИЭГ, 15Δ*bla*2, 15Δ*bla*123 и 120Δ*pur*

Примечание: **А**. – Бактериальные культуры *F. tularensis*; **Б.** – Бактериальные культуры *F. tularensis*, предварительно индуцированные пенициллином; **В.** – Ультразвуковые лизаты интактных культур *F. tularensis*; **Г.** – Ультразвуковые лизаты культур *F. tularensis*, предварительно индуцированных пенициллином. Накопление продукта распада лактамного кольца представлено как изменение оптической плотности при длине волны 495 нм

В качестве индикаторного субстрата для бета-лактамаз мы использовали нитроцефин. Исследовали как живую интактную культуру *F. tularensis*, так и предварительно индуцированную пенициллином (200 мг/л, в качестве индуктора) в течение четырех часов, а также супернатант ультразвукового лизата

бактериальной культуры. Результаты эксперимента представлены на диаграммах в виде кривых динамики оптической плотности, свидетельствующей об общем количестве расщепленного нитроцефина (рисунок 51).

Представленные результаты свидетельствуют, что на живых культурах β-лактамазная активность регистрируется как у штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, так и у штамма *F. tularensis*120Δ*pur*. Главным отличием штаммов является время нарастания лактамазной активности: для штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 6 ч, а для штамма среднеазиатского подвида *F. tularensis* 120Δ*pur* – 24 ч. После предварительной инкубации тестируемой культуры с пенициллином лактамазная активность повышается у обоих штаммов. Безлактамазные штаммы *F. tularensis* 15Δ*bla*2 и 15Δ*bla*123 нитроцефин не расщепляли, их значения не отличались от контроля – спонтанного расщепления нитроцефина, растворенного в жидкой питательной среде, не инокулированной микроорганизмами (данные не приведены).

Также из приведенной диаграммы видно, что оптическая плотность супернатантов клеточных лизатов значительно быстрее достигает высоких значений по сравнению с оптической плотностью суспензий живых клеток, что, скорее всего, указывает на внутриклеточную локализацию β-лактамаз, которые, вероятно, как и у большинства грамотрицательных бактерий, локализованы в периплазматическом пространстве, и при лизисе высвобождаются в окружающую среду, в нашем случае, в реакционную смесь. Предварительная индукция пенициллином незначительно повлияла на лактамазную активность препарата штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а в случае с препаратом штамма *F. tularensis* 120Δ*pur* лактамазная активность даже снижалась. Более выраженная индуцибельная способность живой культуры и слабая индуктивность осветленных лизатов может быть связана с тем, что индукция пенициллином влияет не только на уровень экспрессии лактамаз, но и на эффективность их транспорта в периплазматическое пространство клетки – к месту действия фермента. Молекулы фермента могут быть ассоциированы с другими белками в крупные комплексы или же иммобилизированы в периплазме. В этом случае при

осветлении центрифугированием лизата бактерий часть пула β-лактамаз могла быть связана с клеточным дебрисом и перейти в осадок.

Таким образом, данный эксперимент позволил нам сделать следующие выводы:

1) активные β-лактамазы *F. tularensis*, наиболее вероятно, расположены в периплазматическом пространстве;

2) подтвержден индуктивный механизм регуляции лактамазной активности;

3) показано, что инактивация гена *bla2* приводит к исчезновению лактамазной активности у штаммов *F. tularensis* 15Δ*bla2* и 15Δ*bla123*;

4) установлено, что штамм *F. tularensis* 120Δ*pur* среднеазиатского подвида обладает лактамазной активностью, уровень которой намного ниже, чем у штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ голарктического подвида.

4.5.2 Влияние генов *bla* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на ростовые и иммунопротективные свойства штамма

Как было показано ранее, инактивация генов *bla*1 и *bla*3 не влияла на чувствительность *F. tularensis* 15НИИЭГ к бета-лактамам. Различие в чувствительности по сравнению с исходным родительским штаммом демонстрировали лишь два мутантных штамма – *F. tularensis* 15Δ*bla*2 и 15Δ*bla*123. Поэтому наши дальнейшие исследования были сосредоточены на сравнении свойств этих двух мутантных штаммов с родительским.

Таблица 44 – Влияние генов *bla* в вакцинном штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ на процесс фагоцитоза на модели макрофагоподобных клеток линии J774.A1

Показатель	Время фагоцитоза	Штаммы		
		15 НИИЭГ	15Δ*bla2*	15Δ*bla123*
Log_{10} КОЕ/мл	3 ч	4,8 ± 0,06	4,7 ±0,03	4,4 ±0,06
	48 ч	7,2 ± 0,03	6,3± 0,09	5,8 ± 0,04

Примечание: Результаты представлены в Log_{10} КОЕ/мл (X±δ)

Было установлено, что штаммы *F. tularensis* 15Δ*bla*2 и 15Δ*bla*123 не уступали в скорости роста родительскому штамму как на жидких, так и на

плотных питательных средах, и не утратили способности размножаться внутри мышиных макрофагоподобных клеток J774.1A, хотя уровень размножения снизился на порядок (таблица 44).

Уровень приживляемости клеток мутантных штаммов в органах мышей линии BALB/c также был ниже по сравнению с родительским штаммом, но, тем не менее, штаммы с отсутствующим геном *bla2* приживались и персистировали в селезенке мышей до 11 сут (таблица45).

Таблица 45 – Персистенция клеток штаммов *F. tularensis* с инактивированным геном *bla2* и исходного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в органах мышей BALB/c после подкожного заражения.

Время после заражения, сут	Штаммы *F. tularensis*		
	15 НИИЭГ	15Δ*bla2*	15Δ*bla123*
6	7,35 ± 0,05	7,44 ± 0,04	7,28 ± 0,08
7	6,24 ± 0,05	5,53 ± 0,04	5,02 ± 0,05
11	3,07 ± 0,03	3,00± 0,03	2,9 ± 0,04

Примечание: Результаты представлены в Log_{10} КОЕ/мл (X±δ)

Инактивация генов лактамаз привела к снижению остаточной вирулентности штаммов *F. tularensis* 15Δ*bla2 и*15Δ *bla123* для мышей по сравнению с родительским штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ: LD_{50} для мышей BALB/c увеличилась в 3,2 и 5,6 раз, соответственно (таблица 46).

Таблица 46 – LD_{50} для штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 15 НИИЭГΔ*bla*2 и *F. tularensis* 15 НИИЭГΔ*bla*123

Штаммы *F. tularensis*	$LD_{50,}$ м.к./мышь
F. tularensis 15 НИИЭГ	$3,16 \times 10^2$ ($0,8\times 10^2 – 1,25\times10^3$)
F. tularensis 15Δ*bla2*	$1,0 \times 10^3$($2,55\times10^2$– $6,3\times 10^3$)
F. tularensis 15Δ*bla123*	$1,78\times10^3$ ($5,62\times10^2$– $1,41 \times10^4$)

Для оценки способности полученных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГΔ*bla*2 и *F. tularensis* 15 НИИЭГΔ*bla*123 индуцировать иммунный ответ, способный защищать иммунизированных животных от инфицирования вирулентным штаммом *F. tularensis* 503, мыши были однократно иммунизированы различными

дозами мутантных штаммов. Протективные свойства штаммов оценивали по доле выживших животных (%) всех групп после заражения *F. tularensis* 503 дозой 1×10^2 КОЕ/мышь (100 DCL) (таблица 47).

Таблица 47 – Протективность штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и его вариантов с инактивированными генами бета-лактамаз

Доза иммунизации, КОЕ/мышь	Доза заражения *F. tularensis* 503 КОЕ/мышь	Выживших животных, %		
		Иммунизация 15 НИИЭГ	Иммунизация 15 Δ*bla2*	Иммунизация 15Δ*bla123*
1×10^2	1×10^2	100	100	100
1×10^3		100	100	100
1×10^4		100	100	100
Контроль		0		

Таким образом, штаммы *F. tularensis* с инактивированными генами бета-лактамаз были сопоставимы с родительским штаммом 15 НИИЭГ по жизнеспособности, вирулентности и протективным свойствам.

4.6 Обсуждение результатов

Проведенный нами сравнительный анализ рекомбинантных штаммов *F. tularensis* с делециями генов *qseC, purMCDN, recA, recD* и *iglC* (одной и двух копий), созданных на основе вакцинного штамма 15 НИИЭГ, позволил оценить влияние мутаций по перечисленным генам на иммунобиологические свойства штаммов. Несмотря на то, что получение штаммов преследовало разные цели, изучая их по определенному алгоритму, мы оценили перспективность инактивации этих генов для улучшения свойств существующей вакцины.

Показано, что инактивация гена *qseC* приводит к потере устойчивости к бактерицидному действию нормальной кроличьей сыворотки, снижению способности бактерий размножаться в макрофагах, продуцировать типичный для *F. tularensis* ЛПС S-формы. Штамм с данной мутацией для мышей стал авирулентным и, как следствие, утратил иммунногенные свойства.

Установлено, что делеция генов *purMCDN* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ также приводит к полной потере вирулентности и очень низкой протективности

для мышей. Мутантный штамм способен размножаться в макрофагоподобных клетках только при добавлении пуринов в среду культивирования.

Выявлено, что удаление обеих копий гена *iglC* приводит к полной потере вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ вирулентности и протективности для мышей. Удаление одной копии гена *iglC* приводит к незначительной потере вирулентности, сохраняя иммуногенные и протективные свойства.

Делеция генов *recA* и *recD* приводит к репрессии механизма рекомбинации. Инактивация гена *recD* изменяет ростовые свойства штамма, значительно снижает вирулентность и протективность. Инактивация гена *recA* не значительно снижает вирулентность, но повышает стабильность штамма, снижая способность к диссоциации.

Предварительная оценка способности штаммов с инактивированными генами *qseC, pur, recA, recD* и *iglC* (одной и двух копий) переживать и размножаться в клетках макроорганизма проводилась на культуре клеток макрофагоподобной линии J774.1A, что позволило существенно сократить количество экспериментальных животных.

Результаты по приживаемости штаммов, которые не становились полностью авирулентными для мышей, мы оценивали на мышах линии BALB/c, а не на морских свинках, как указано в существующих требованиях к вакцинным штаммам [49], что также позволило существенно сократить количество экспериментальных животных.

Полученные нами результаты по изучению способности переживать и размножаться в культуре клеток линии J774.1A позволяют сделать предварительные выводы о значении проведенных генетических манипуляций. Штаммы, сохранившие способность к размножению в макрофагоподобных клетках, обладали лучшей способностью приживаться в организме мышей линии BALB/c (15/23-1 и 15Δ*recA*) и, следовательно, могут расцениваться в качестве наиболее перспективных кандидатов в вакцинные штаммы *F. tularensis* .

Снижение реактогенности – одна из актуальных задач для улучшения свойств существующей вакцины. Оценка степени реактогенности вакцинных штаммов является их важной характеристикой. В качестве критериев реактогенности изучались динамика изменения веса и гематологические

показатели (количество лейкоцитов, тромбоцитов, гамма-интерферона). Поскольку инактивация генов *qseC* и *pur* привела к полной потере вирулентности, мы не изучали влияние этих штаммов на реактогенные свойства. Авирулентный штамм с делецией двух копий гена *iglC* был включен в панель изучаемых штаммов для того, чтобы оценить влияние разной степени инактивации этого гена на реактогенные и иммуногенные свойства.

Мы оценивали реактогенность на штаммах с инактивированным геном *iglC* – *F. tularensis* 15/23-1 и 15/23-2 и инактивированными генами *recA* и *recD* *F. tularensis* 15Δ*recA* и 15Δ*recD.* Иммунизация двумя штаммами – *F. tularensis* 15/23-2 и 15Δ*recD* – не вызывала снижения веса и изменения гематологических показателей. Иммунизация штаммами *F. tularensis* 15/23-1 и 15Δ*recA* вызывала снижение веса и изменение гематологических показателей, однако, эти изменения были менее выраженными, чем вызываемые иммунизацией исходным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Было показано, что иммунизация мышей линии BALB/c дозой 10^2КОЕ на мышь штаммами *F. tularensis* 15/23-1 и 15Δ*recA* вызывает снижение веса не более, чем на 10%, в то время как иммунизация исходным штаммом 15 НИИЭГ уменьшала вес животных почти на 20%. Кроме того, период снижения веса животных при иммунизации штаммами *F. tularensis* 15/23-1 и 15Δ*recA* был не продолжителен, всего 4-5 дней, в то время как для исходного штамма вес животных в течение всего периода наблюдений к норме не возвратился (рисунок 37 и 46).

Ранее изучение изменения веса животных исследовали после заражения иммунных мышей вирулентным штаммом *F. tularensis* Schu S4, и было показано, что вес стремительно падает на 3-5 сутки в группе не иммунизированных мышей, а в иммунных группах он имеет незначительные колебания [396]. Мы предлагаем использовать этот показатель для характеристики реактогенности вакцинных штаммов, поскольку снижение веса свидетельствует о снижении метаболической активности, а, значит, может служить критерием отрицательного влияния штамма на организм экспериментальных животных. Ранее этот показатель оценивали на морских свинках, взвешивая их индивидуально. По предлагаемой нами методике вес оценивается в целом (взвешивается целая группа мышей), не учитывая колебаний веса отдельных особей. Мыши – более экономная экспериментальная

модель, позволяющая существенно увеличить количество животных в группах, тем самым повышая степень достоверности результатов. Нами показано, что мыши линии BALB/c – более чувствительная модель, позволяющая оценить доброкачественность вакцинного процесса, поскольку использование даже небольших заражающих доз вызывает развитие поствакцинальных реакций, в основе которых лежит инфекционный процесс. На наш взгляд, наиболее адекватной моделью для оценки реактогенности являются мыши, что позволит оценивать новые создаваемые вакцинные штаммы против туляремии более эффективно.

Согласно основным требованиям к вакцинным туляремийным штаммам [49], изучение гематологических показателей проводят для определения количества Т- и В-лимфоцитов и фагоцитарной активности макрофагов. В доступной научной литературе мы не нашли сведений о действии туляремийной вакцины на процесс кроветворения. Наши исследования выявили, что при иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ развивается лейкопения в период 4-7 сут, которая сменяется лейкоцитозом в период 14-21 сут. У мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15/23-1 и 15Δ*recA,* лейкопении не наблюдали, и лейкоцитоз был кратковременным и незначительным. Кроме того, иммунизация штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, 15/23-1 и 15Δ*recA* приводила к развитию тромбоцитопении, которая сменялась тромбоцитозом, однако, наибольшие колебания этого показателя наблюдали при вакцинации родительским штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Повышение уровня гамма-интерферона в сыворотке свидетельствует об остроте воспалительного процесса. У мышей, вакцинированных штаммом 15 НИИЭГ количество этого цитокина в сыворотке было почти в 10 раз выше, а для штаммов 15/23-1 и 15Δ*recA* в 6-7 раз выше, чем в сыворотках мышей после введения штаммов 15Δ*recD* и15/23-2 (рисунок 39 и 48). Характер изменения количества лейкоцитов и гамма-интерферона свидетельствует о более выраженном инфекционном процессе при вакцинации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и может также служить критерием реактогенности штаммов. Тромбоцитопения, сменяющаяся тромбоциозом, выявленная нами при иммунизации изучаемыми вакцинными туляремийными штаммами, является, видимо, закономерным процессом и требует

более детального изучения для понимания участия этих форменных элементов крови в патогенезе туляремии (таблица 33, рис 47Б).

Данные по изучению специфического гуморального и клеточного иммунитета свидетельствуют, что перспективные штаммы *F. tularensis* 15/23-1 и 15ΔrecA вызывают развитие специфического противотуляремийного иммунитета, сопоставимого с иммунным ответом на существующий вакцинный штамм. Следует отметить сравнительно невысокие титры антител к УЗД *F. tularensis* 15 НИИЭГ в сыворотке иммунизированных животных на 21 сутки после иммунизации (таблица 34 и 37). Возможно, это связано с низкой иммунизирующей дозой, которая вызывает развитие процесса, имеющего пограничное течение между иммунным и инфекционным, создавая нестерильный иммунитет, ослабляя развитие антителообразования и, соответственно, развитие гуморальной защиты. Известно, что при туляремии наиболее важно клеточное звено иммунитета [167], поскольку именно оно обеспечивает эффективность и длительность защиты от вирулентных штаммов. Мыши являются очень чувствительной моделью для туляремийной инфекции, что, с одной стороны, усложняет работу по созданию вакцинных штаммов (в связи с низкими значениями LD_{50}), с другой стороны, низкие значения LD_{50} свидетельствуют о том, что у мышей, в отличие от морских свинок, легко развивается инфекционный процесс (глава 5). Поэтому оценка остаточной вирулентности на мышах может также служить показателем реактогенности штаммов.

Таким образом, изучение аттенуированных штаммов *F. tularensis* 15Δ*qseC*, 15Δ*purMCDN*, 15/23-1, 15/23-2, 15Δ*recA* и 15Δ*recD* позволило нам сделать выводы, что для улучшения свойств существующей туляремийной вакцины, в частности, для снижения ее реактогенности и повышения стабильности, наиболее рационально создать на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ штамм с делецией одной копии гена *iglC* и гена *recA*. Такой штамм был нами создан и изучен в соответствии с основными требованиями к новым вакцинным туляремийным штаммам как на мышах, так и на морских свинках.

Так как в нашем исследовании показано, что у *F. tularensis* subsp. *holarctica* по отношению к широкому спектру β-лактамных антибиотиков активной является лишь лактамаза Bla2, а в других работах показана активность этого фермента у

подвидов *tularensis* и *novicida* [306], логично предположить, что это утверждение верно и для подвида *mediasiatica*. В этом случае к снижению эффективности расщепления лактамного кольца антибиотиков, по всей видимости, привела единичная аминокислотная замена G→R в 97 положении белка Bla2 [436.]. Вызванные этой заменой конформационные изменения могли привести к снижению сродства фермента к субстрату либо к увеличению времени существования фермент-субстратного комплекса, что, в итоге, и обусловило резкое повышение времени реакции. Так как для определения лактамазной активности применяются цветные тесты с нитроцефином или с бензилпенициллином и крезоловым красным, в которых расщепление лактамного кольца антибиотика тестируемой культурой детектируется визуально по изменению окраски, то значительное время (около 12 ч), необходимое для расщепления количества антибиотика, достаточного для визуальной фиксации результата, привело к возникновению мнения, что *F. tularensis* subsp *mediasiatica* лактамазной активностью не обладает вообще. Следует все же отметить, что, несмотря на не вполне верную интерпретацию результатов, получаемых в указанных выше тестах, их диагностическая ценность остается несомненной.

Обнаруженное нами влияние концентрации микробных клеток на антибиотикоустойчивость можно объяснить, исходя из удельной нагрузки антибиотика на микроорганизм. Так, при концентрации бактерий 10^9 КОЕ/мл и при концентрации антибиотика, например, ампициллина, 2 мг/мл, на 1 бактериальную клетку приходится около 10^8 молекул антибиотика. При этом, если антибиотик распределен по всему объему равномерно, а объем клетки *F. tularensis* мы примем за 1мкм^3 (на самом деле меньше), то одновременно на 1 клетку воздействует не более 10^5 молекул антибиотика. Учитывая, что *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* и безлактамазные мутанты *F. tularensis* subsp. *holarctica* способны к росту в таких условиях, можно предположить, что туляремийный микроб способен противостоять этому уровню антимикробного воздействия за счет барьерной функции капсулы и внешней мембраны, эффлюкса антибиотика из периплазматического пространства, а также, возможно, за счет

увеличения продукции пенициллин-связывающих белков (ПСБ) для того, чтоб количества ПСБ, не инактивированных антибиотиком, оставалось достаточно для поддержания баланса процессов автолиза и синтеза клеточной стенки. При снижении концентрации микроорганизмов до 10^6 КОЕ/мл на одну клетку *F. tularensis* приходится уже 10^{11} молекул антибиотика, из которых с каждой клеткой взаимодействует одновременно 10^8. Этого количества оказывается достаточно для подавления роста штаммов с инактивированными лактамазами, или же со сниженной эффективностью их работы. В последнем случае время, необходимое для расщепления антибиотика и снижения его нагрузки на клетку оказывается достаточно большим, чтоб значительная часть бактерий успела погибнуть.

Остается невыясненной роль лактамаз Bla3 и Bla1, а также арилсульфатазы (для штаммов голарктического подвида, у которых она представлена отдельным от Bla1 белком). Наличие в этих белках характерных для β-лактамаз доменов вступает в противоречие с тем, что инактивация кодирующих их генов у *F. tularensis* subsp *holarctica* 15 НИИЭГ не влияет на антибиотикоустойчивость мутантных штаммов.

Туляремийный микроб, в отличие от возбудителей многих более широко распространенных инфекций, не испытывая селективного давления клинически значимыми антибиотиками, тем не менее, как и другие франциселлы, способен в течение длительного времени выживать в окружающей среде. При этом *F. tularensis* может испытывать воздействие посторонней микрофлоры, в том числе грибов, выделяющих вещества, подавляющие рост бактерий, в числе которых могут быть и β-лактамы. Данные лактамы могут сильно отличаться по структуре от антибиотиков, применяемых в клинической практике, и секретироваться в количествах значительно меньших, чем терапевтические дозы. В этом случае эволюционировавшие под их селективным давлением β-лактамазы франциселл могут быть достаточно специализированными и не проявлять активности по отношению к другим β-лактамам, в том числе клинически эффективным препаратам. Такими ферментами, видимо, и являются Bla3 и Bla1.

Хотя в отношении последнего фермента стоит заметить, что, если он и обладает лактамазной активностью, то это, видимо, не единственная функция данного фермента. Об этом говорит наличие в этом белке арилсульфатазного домена, и даже после распада одного белка на два отдельных у голарктического подвида, белок, сохранивший арилсульфатазный домен, предположительно является жизненно важным для *F. tularensis*. На это указывают многочисленные неудачные попытки инактивирования гена, кодирующего арилсульфатазу, у *F. tularensis* subsp *holarctica* 15 НИИЭГ в наших экспериментах.

Подводя итоги этой главы, можно сделать следующие выводы:

1) У штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ выявлено три гена, кодирующих одну металло – β-лактамазу Bla1, и две сериновые β-лактамазы Bla2 и Bla3, а также арилсульфатазу (Ars), содержащую домен, характерный для металло- β-лактамаз. При этом ген *ars* прекрывается с геном *bla1*. У всех изученных штаммов *F. tularensis* практически идентичный состав этих генов, их последовательность, расположение в геноме, за исключением того, что у штаммов, относящихся к голарктическому подвиду, *ars* и *bla1* представлены двумя отдельными перекрывающимися генами, а у штаммов других подвидов они представляют собой одну рамку считывания. В остальном выявленные различия слишком незначительны для проведения подвидовой дифференциации молекулярно-генетиечскими методами.

2) Разработана методика инактивации генов β-лактамаз *F. tularesis* гомологичной рекомбинацией с помощью плазмиды pGM5. На ее основе создана более эффективная плазмида pGM6.

3) При инактивации Bla2 значительно уменьшается устойчивость штамма *F. tularensis* subsp *holarctica* 15 НИИЭГ к β-лактамам, в первую очередь к пенициллинам и аминопенициллинам. Штаммы с повышенной чувствительностью к β-лактамам – *F. tularensis* 15Δ*bla*2 и 15Δ*bla*123 – депонированы в «ГКПМ-Оболенск», как перспективные модели для генно-инженерных экспериментов.

Функцию Bla1, Bla3 и Ars установить не удалось, так как штаммы с инактивированными генами *bla1* и *bla3* по своим свойствам не отличались от родительского штамма, а ген *ars* не удалось инактивировать, что указывает на жизненную важность кодируемого им белка.

4) Пониженная антибиотикоустойчивость *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* проявляется лишь при концентрации микробных клеток ниже 10^6 КОЕ/мл. При этом, вопреки распространенному мнению, этот подвид все же обладает β-лактамазной активностью, хотя скорость гидролиза антибиотиков при этом снижена. Причиной снижения эффективности гидролиза β-лактамов является, видимо, замена G→R в 97 положении белка Bla2.

ГЛАВА 5 ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММА *F. TULARENSIS* 15/23-1Δ*RECA* – ПРОТОТИПА ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ

Анализ данных по изучению иммунобиологических свойств полученных мутантов, приведенных в главе 4, свидетельствует, что к улучшению свойств существующей вакцины может привести делеция одной копии гена *iglC* и гена *recA* в существующем вакцинном штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Такой штамм был нами создан методом аллельного обмена, используя суицидный вектор pGM5 путем инактивации одной копии гена *iglC* и последующей инактивации гена *recA*. Получение этого штамма подробно описано в нашей статье [47а]. Полученный штамм был обозначен как *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* и депонирован в Государственной коллекции «ГКПМ-Оболенск» под номером В-6623. Одним из важнейших свойств этого штамма, существенно отличающим его от родительского штамма, является его генетическая маркированность.

Поскольку штамм рассматривался, как потенциальный кандидат в вакцины, его проверка проводилась в соответствии с основными требованиями к новым вакцинным штаммам. Однако, учитывая результаты, изложенные в предыдущей главе, наряду с традиционными испытаниями, были внесены дополнительные исследования по изучению способности нового штамма к внутриклеточному размножению в фагоцитирующих клетках. Кроме того, изучение реактогенных свойств было дополнено исследованием гематологических показателей и динамики изменения веса вакцинированных животных.

5.1 Сравнительная оценка культурально-морфологических и иммунобиологических свойств прототипа живой туляремийной вакцины *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* и родительского штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

5.1.1 Изучение культурально-морфологических свойств штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*

Первым этапом при изучении свойств нового полученного штамма – потенциального кандидата в вакцины – является идентификация испытуемого вакцинного штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* по видовым признакам.

Для идентификации по видовым признакам штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* были оценены следующие параметры:

1) морфология и окраска бактерий в мазках и специфическое свечение в прямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ);

2) характер роста на питательной среде Мак-Коя;

3) рост на простых питательных средах типа мясопептонного агара (МПА) и агара Хоттингера;

4) биохимические свойства, характерные для представителя соответствующего подвида *F. tularensis*;

5) агглютинация с диагностической туляремийной сывороткой для РА;

6) полимеразная цепная реакция (ПЦР) со специфичными для вида *F. tularensis* праймерами;

7) ПЦР со специфичными для потенциального вакцинного штамма праймерами.

Проведенные исследования показали, что бактерии штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* представляют собой неподвижные, грамотрицательные, образующие капсулу мелкие полиморфные кокковидные и палочковидные клетки размерами 0,2-0,7 мкм. Видимых отличий в скорости роста и морфологии колоний штаммов *F. tularensis* 15НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* при выращивании на плотной питательной среде FTA отмечено не было (рисунок 52). При окрашивании культуры диагностическими флуоресцирующими туляремийными сухими иммуноглобулинами (ФСП-42-0181-5315-04) выявлялось специфическое свечение, оцениваемое на «4 креста».

А **Б**

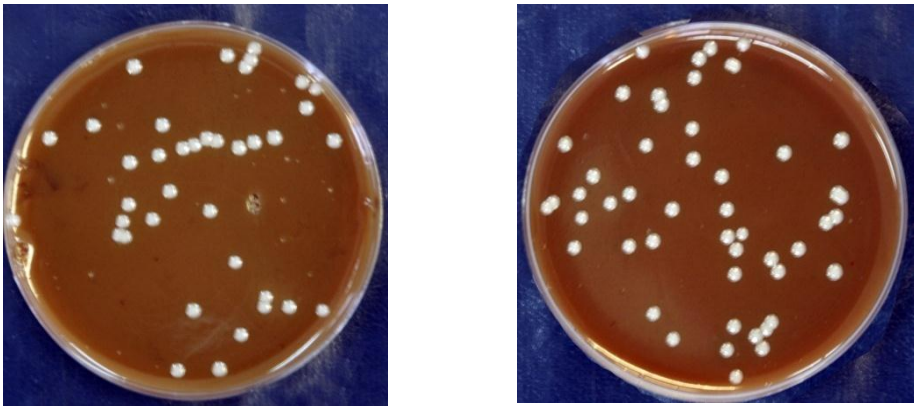


Рисунок 52 – Морфология колоний штаммов *F. tularensis* 15НИИЭГ(А) и 15/23-1Δ*recA*(Б) на плотной питательной среде FTA через 48 ч.

Показано, что бактерии штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* являются аэробами, ауксотрофы, не растут на простых питательных средах, культивируются при температуре 37 °С на средах с добавлением витаминов и дефибринированной крови. Колонии вырастают на FT-агаре через 48-72 ч. На свернутой желточной среде Мак-Коя штамм растет в виде почти бесцветного, извилистого, слегка блестящего налета. Штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* растет как в жидких, так и на плотных питательных средах, причем различий в динамике роста бактерий обоих штаммов при культивировании на жидкой питательной среде FTB отмечены не были. Время удвоения клеток, лимитируемое содержанием кислорода в культуральной среде, составляло ~2 ч. Особенно следует отметить, что при последовательных пересевах на плотных питательных средах этот штамм не диссоциировал в другие формы, что свидетельствует о стабильности штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* (рисунок 52).

Изучение биохимических свойств штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* показало, что они соответствуют свойствам туляремийного микроба, принадлежащего *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Показано, что данный штамм не чувствителен к эритромицину, олеандомицину, полимиксину, пенициллину, стрептомицину, не обладает цитруллинуреидазной активностью, расщепляет глюкозу, левулезу, мальтозу, маннозу с образованием кислоты без газа, не выделяет индол, образует сероводород. В пробирочной реакции агглютинации с диагностической туляремийной сывороткой в титре 1:3200 культура штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* давала положительную реакцию, оцениваемую, как «4 креста», с образованием крупнохлопчатого агглютината.

Показано также, что ДНК штамма дает положительную реакцию в ПЦР со специфическими для голарктического подвида праймерами, а введенные мутации верифицированы в ПЦР со специфическими для гена *iglC* и гена *recA* праймерами.

5.1.2 Изучение способности штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* к внутриклеточному размножению в культуре первичных перитонеальных макрофагов и в культуре макрофагоподобных клеток линии J774.1A

Изучение способности бактерий выживать и размножаться в цитоплазме фагоцитирующих клеток проводили *in vitro* с использованием перитонеальных

макрофагов мыши и перевиваемой клеточной линии мышиных макрофагоподобных клеток J774.1A. Перитонеальные макрофаги и клетки линии J774.1A были инфицированы штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* и через 3, 24 и 48 ч было определено количество живых микробных клеток, находящихся в макрофагах (рисунок 53).

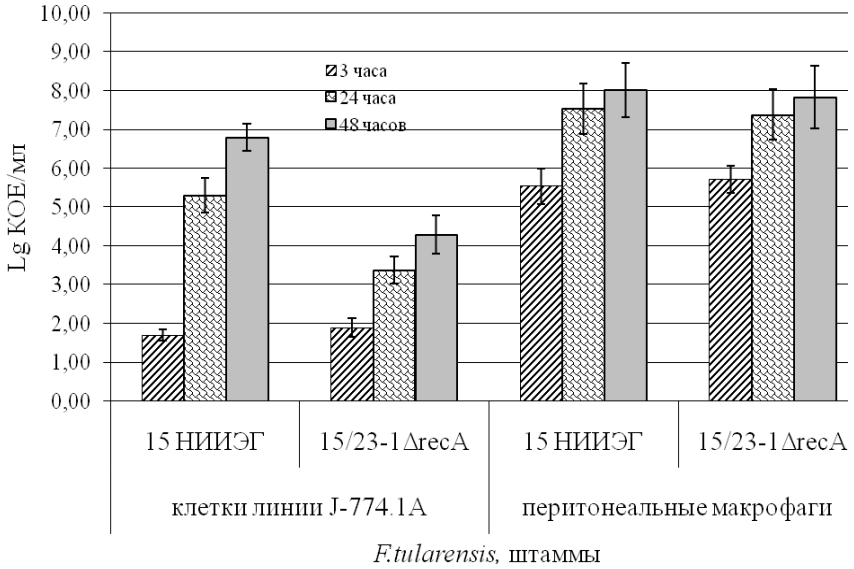


Рисунок 53 – Сравнение способности к фагоцитозу исходного вакцинного штамма *F. tularensis* 15НИИЭГ и нового потенциального кандидата в вакцины штамма 15/23-1Δ*recA* на моделях макрофагоподобных клеток линии J774.1A и перитонеальных макрофагах мышей линии BALB/c.

Примечание: Макрофаги инфицировались в соотношении 100:1, количество бактерий в макрофагах определялось через 3, 24 и 48 ч после инфицирования; результаты показаны, как значение Lg КОЕ/мл ± доверительный интервал ($p<0.05$) по результатам трех независимых экспериментов

Согласно приведенным данным, в макрофагоподобных клетках J774.1A новый потенциальный вакцинный штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* без одной копии гена *iglC* и гена *recA* размножался в 8-10 раз хуже, чем исходный штамм *F. tularensis* 15НИИЭГ, тогда как динамика размножения мутантного штамма в перитонеальных макрофагах мыши практически не отличалась от динамики размножения клеток родительского штамма. Наблюдаемую разницу в полученных результатах можно объяснить следующим образом. Поскольку в процессе получения клеток перитонеального экссудата мышей происходит их стрессирование, приводящее к некоторому снижению их физиологических функций, то можно считать, что, несмотря на выявленное ранее частичное ухудшение способности к внутриклеточному размножению, клетки штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* смогли преодолеть ослабленные стрессом

фагоцитарные механизмы клеток перитонеального экссудата. С другой стороны, фагоцитарные механизмы макрофагоподобных клеток J774.1A более стабильны в силу адаптированности перевиваемых линий клеток к условиям *in vitro*. Поэтому очевидны преимущества проведения экспериментов по оценке способности к внутриклеточному размножению на клеточных линиях.

Таким образом, эксперименты по изучению внутриклеточного размножения бактерий полученного штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* демонстрируют сохраненную, хотя и несколько сниженную, способность штамма к размножению в фагоцитирующих клетках. Именно сохранение способности штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* к внутриклеточному размножению является необходимым условием иммуногенности разрабатываемых кандидат вакцин.

5.2 Оценка остаточной вирулентности, безвредности, стабильности и реактогенности, иммуногенных и защитных свойств прототипа живой туляремийной вакцины

Для научно-исследовательских учреждений, проводящих исследования в области разработки, контроля вакцинных штаммов и доклинических испытаний новых вакцинных штаммов туляремийного микроба, основополагающим документом являются методические указания "Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба" [49]. Нами проведена оценка количества животных, необходимых для осуществления полнообъемных испытаний одного испытуемого штамма. По общим предварительным оценкам, для таких экспериментов необходимо около 700 морских свинок, что обусловливает высокую стоимость проведения подобных экспериментов.

Для оптимизации и снижения затратности экспериментов нами были проведены исследования по сравнению свойств нового штамма *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA с родительским штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ как на морских свинках, так и на мышах линии BALB/c.

При проведении испытаний нового вакцинного штамма в соответствии с МУ 3.3.1.2161-07 необходимо осуществить ряд следующих исследований:

1. Определение степени остаточной вирулентности и безвредности испытуемого вакцинного штамма на морских свинках и белых мышах.

2. Определение реактогенности испытуемого вакцинного штамма на морских свинках (прижизненные наблюдения).

3. Определение безвредности и остаточной вирулентности испытуемого вакцинного штамма на морских свинках по морфологическим показателям.

4. Определение стабильности биологических свойств испытуемого вакцинного штамма на морских свинках.

5. Определение влияния испытуемого вакцинного штамма на иммунную систему морских свинок.

6. Прививаемость и иммуногенная активность испытуемого вакцинного штамма на морских свинках.

Мы проводили свои исследования в соответствии МУ 3.3.1.2161-07, внося определенную корректировку на некоторых этапах.

5.2.1 Определение остаточной вирулентности штамма *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA для морских свинок и мышей линии BALB/c

Чувствительность морских свинок и мышей линии BALB/c к инфицированию вакцинным штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ и потенциальным кандидатом в вакцины штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* определяли путем подкожного введения бактерий. Мышам вводили бактерии в диапазоне доз 10-10^3 КОЕ для штамма *F. tularensis* 15НИИЭГ и 10-10^6 КОЕ для штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, а морским свинкам – в дозах 10^7 -10^9 КОЕ для обоих штаммов. Через 28 суток после инфицирования и наблюдения за животными рассчитывали величину LD_{50} (таблица 48).

Таблица 48 – Остаточная вирулентность штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* для морских свинок и мышей (по величине LD_{50})

Штаммы *F. tularensis*	LD_{50}, м.к./животное	
	морские свинки	мыши линии BALB/c
15 НИИЭГ	$>10^9$	79,0(40÷110)
15/23-1Δ*recA*	$>10^9$	$2{,}0\times10^4$ ($6{,}4\times10^3 \div 6{,}0\times10^4$)

Данные, приведенные в таблице 48, свидетельствуют, что оба штамма авирулентны для морских свинок, а LD_{50} рекомбинантного штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* для мышей снижена более, чем на два порядка (таблица 48) по

сравнению с родительским штаммом. Следовательно, этот штамм можно считать перспективным для проведения дальнейших исследований.

5.2.2 Оценка приживаемости штамма *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA по степени и длительности обсемененности селезенки морских свинок и мышей линии BALB/c

Принято судить о безвредности культуры испытуемого штамма по следующим параметрам: по реакции организма морских свинок на ее введение, по приживаемости и распространению бактерий в организме, по выявленным у подопытных морских свинок патоморфологическим изменениям, степени их выраженности и обратимости [49].

Вакцинные штаммы туляремийного микроба, согласно МУ 3.3.1.2161-07, должны обладать определенной степенью остаточной вирулентности, т.е. в течение 3 - 15 сут должны размножаться в организме привитых животных и вызывать доброкачественный вакцинальный процесс. Бактерии вакцинных штаммов *F. tularensis* должны приживаться в организме морских свинок и выявляться в высевах из мест введения и из регионарных лимфатических узлов в течение 20-30 сут, а из селезенки и печени – в течение первых 10-15 сут. Организм морских свинок, как правило, к 30 сут освобождается от вводимого туляремийного вакцинного штамма.

Нами были получены данные по приживаемости штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* в органах морских свинок и мышей. На рисунке 55, как наиболее показательные, приведены данные по обсемененности селезенок морских свинок и мышей.

Приведенные данные показывают, что элиминация клеток испытуемого штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* и родительского штамма 15 НИИЭГ из селезенок морских свинок происходит без стадии размножения (рисунок 54, А). В течение первых 4 сут при дозе вакцинации 1×10^8 м.к./свинку количество бактерий в селезенке морских свинок, инфицированных штаммом 15 НИИЭГ, быстро снижалось на 3,5 порядка, а у морских свинок, инфицированных штаммом 15/23-1Δ*recA* – на 4 порядка. В последующие дни происходило постепенное

освобождение селезенки от микробов. Штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ персистировал дольше (бактерии штамма высевались из селезенок морских свинок на 21 сут), тогда как к этому сроку клетки штамма *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA уже полностью элиминировались.

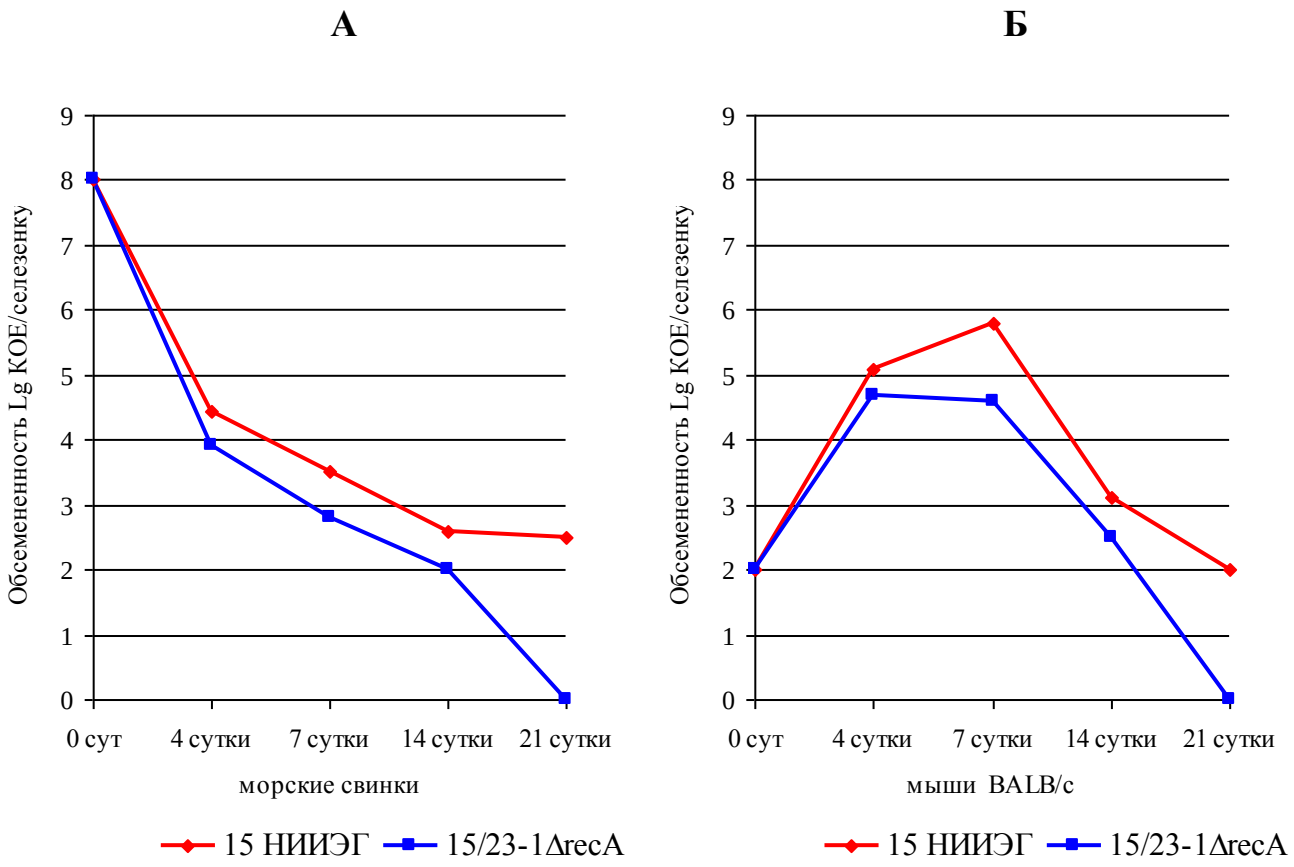


Рисунок 54 – Динамика обсемененности селезенок морских свинок (А) и мышей линии BALB/c (Б) после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA*.
Примечание: Доза иммунизации – 10^8 м.к./свинку, 10^2 м.к./мышь.

В отличие от морских свинок, оба штамма *F. tularensis* у мышей BALB/c вызывали инфекционный процесс: при дозе вакцинации 1×10^2 м.к./мышь обсемененность селезенок для штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* на 4 сут достигала уровня $1{,}3\times10^5$ и 5×10^4 КОЕ/селезенку, соответственно (рисунок 54, Б).

Динамика персистенции обоих штаммов в организмах мышей была в целом сходной. Обсемененность селезенок мышей, иммунизированных родительским штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, достигала максимальных значений к 7 сут, уже к 14 сут наблюдалось почти двукратное снижение их обсемененности, однако еще на 21 сут бактерии в органе сохранялись на уровне дозы вакцинации.

Степень обсемененности селезенок мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, в отличие от родительского штамма, достигла максимума уже на 4 сут и сохранялась на том же уровне вплоть до 7 сут, однако уже к 14 сут обсемененность снижалась почти в 2 раза и к 21 сут наблюдалась элиминация штамма из селезенки.

Аналих полученных данных показывает, что испытуемый штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* не утратил способности к персистенции в организме животного, однако, ему свойственно обусловливать меньшую обсемененность и более быструю элиминацию из селезенки, что, вероятно, и приводит к снижению его вирулентности.

5.2.3 Оценка патоморфологических изменений у морских свинок и мышей линии BALB/c, вызываемых введением штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*

По степени остаточной вирулентности испытуемого штамма характеризуют специфические для вакцинального процесса морфологические изменения (макроскопические и гистологические), возникающие в тканях места введения культуры у морских свинок, в регионарных и отдаленных лимфатических узлах, а также в ряде внутренних органов (печень, селезенка, легкие, почки с надпочечниками, сердце) [297]. Если испытуемый штамм в соответствующих дозах при прочих равных условиях чаще вызывает у морских свинок более выраженные изменения, чем контрольный вакцинный штамм 15 НИИЭГ, то такой штамм туляремийного микроба не может быть признан вакцинным [49].

Нами была проведена оценка патоморфологических изменений органов морских свинок и мышей линии BALB/c, вызываемых введением штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* по сравнению с родительским штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Макроскопическая картина. На 4 сут после введения культуры контрольного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе $5x10^8$м.к./свинку наблюдалось увеличение паховых лимфатических узлов в месте введения, отек и множественные мелкие кровоизлияния в окружающую клетчатку. Введение штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* в дозе 10^8м.к./свинку привело к отеку окружающей клетчатки и кровенаполненности сосудов без кровоизлияний. При

иммунизации обоими штаммами наблюдалось увеличение и полнокровность селезенок; видимых изменений в печени и легких обнаружено не было.

После иммунизации морских свинок макроскопическая картина на 7 сут была различной – у одного из животных, зараженных контрольным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, наблюдалось двукратное увеличение лимфоузла в месте введения с обильным кровоизлиянием в окружающую клетчатку, а также незначительное увеличение контралатерального лимфоузла; в селезенке наблюдались единичные очажки серовато-белого цвета. У остальных морских свинок наблюдали картину, соответствующую 4 дню.

Иммунизация штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* также приводила к увеличению лимфоузлов в месте введения с полнокровием окружающей клетчатки, тогда как паренхиматозные органы находились в норме.

После иммунизации контрольным штаммом у морских свинок на 14 сут наблюдалось уплотнение лимфатических узлов в месте введения, у двух морских свинок – умеренная гиперемия подкожной клетчатки; селезенка увеличена и умеренно полнокровна. У одной морской свинки после иммунизации испытуемым штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* на 14 сут была увеличена только селезенка.

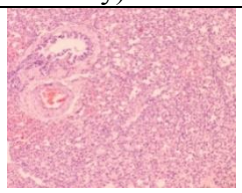
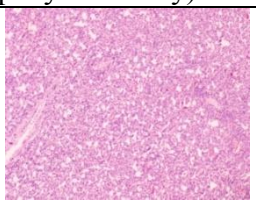
На 21 сут у морских свинок, иммунизированных контрольным и испытуемым штаммами, органы находились в норме без видимых изменений.

Сходную макроскопическую картину наблюдали и у мышей, иммунизированных контрольным и испытуемым штаммами в дозе 1×10^2 м.к./мышь. При внешнем осмотре на 4 сут мыши, иммунизированные штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, были менее подвижны и взъерошены. При вскрытии на месте введения наблюдались множественные кровоизлияния, отмечалось увеличение лимфатических узлов, в том числе контралатеральных и отдаленных. Селезенки характеризовались полнокровием, на 7-14 сут наблюдали их увеличение в 2-3 раза с единичными или множественными очагами белого цвета. У 50% мышей отмечалось увеличение печени. На 21 сут у мышей, иммунизированных контрольным штаммом, наблюдалось увеличение селезенки у 40% мышей.

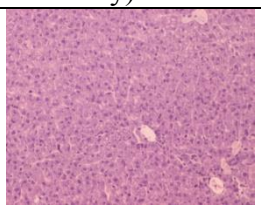
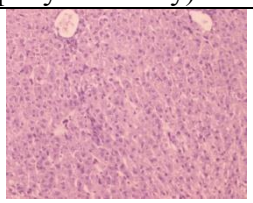
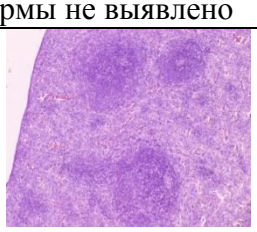
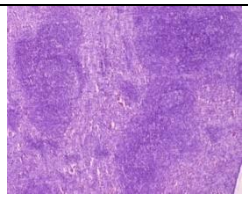
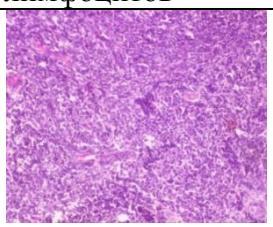
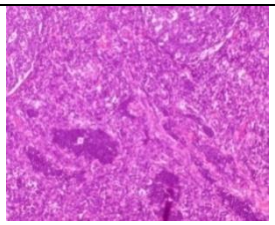
На 4 сут у мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, при внешнем осмотре не наблюдали изменений; мыши были активны. При вскрытии на месте введения отмечались кровенаполненность сосудов и незначительное увеличение селезенки у 40% мышей. К 7-14 сут увеличение и полнокровие селезенки отмечалось уже у 60% мышей. Тем не менее, наблюдаемые изменения носили обратимый характер, и уже к 21 сут изменений в состоянии органов иммунных мышей не наблюдалось.

Дополнительно были проведены патоморфологические исследования и на морских свинках на 28 сут после введения штаммов (таблица 49). Результаты гистологических исследований показали, что оба штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* вызывают допустимые, согласно МУ 3.3.1.2161-07, патоморфологические изменения в организме морских свинок. Показано, что оба штамма не оказывают выраженного токсического действия на морских свинок при подкожном введении доз 5×10^5 м.к., 5×10^7 м.к., 5×10^9 м.к. для штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 1×10^6 м.к., 1×10^8 м.к., 1×10^{10} м.к. для штамма 15/23-1Δ*recA*. Но, в отличие от штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* вызывал более выраженную реакцию пролиферации в ткани селезенки (центры размножения) и в региональных лимфатических узлах, где было обнаружено накопление большого количества лимфоцитов. Эти патоморфологические изменения в органах морских свинок свидетельствуют о вероятном снижении реактогенных свойств штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* и об усилении его иммуногенности.

Таблица 49 – Патоморфологистологические изменения в органах морских свинок на 28 сут после вакцинации

Орган	Штаммы *F. tularensis*	
	15 НИИЭГ ($5x10^9$м.к./морскую свинку)	15/23-1Δ*recA* ($1x10^{10}$м.к./ морскую свинку)
Легкие	 Микроскопических отклонений от нормы не выявлено	 Микроскопических отклонений от нормы не выявлено

Продолжение таблицы

Орган	Штаммы *F. tularensis*	
	15 НИИЭГ (5х10^9м.к./морскую свинку)	15/23-1Δ*recA* (1х10^{10}м.к./ морскую свинку)
Печень	 Микроскопических отклонений от нормы не выявлено	 Микроскопических отклонений от нормы не выявлено
Селезенка	 Центры размножения не выражены или состоят из небольшого количества клеток. В красной пульпе небольшое увеличение количества лимфоцитов	 Выраженная гиперплазия белой пульпы с большим количеством активных центров размножения. В красной пульпе – большое количество лимфоцитов
Лимфатические узлы	 Единичные, небольших размеров, плотные скопления лимфоцитов в синусах лимфатических узлов	 Множественные, из большого количества клеток, плотные скопления лимфоцитов в синусах лимфатических узлов

5.2.4 Определение стабильности биологических свойств испытуемого вакцинного штамма на морских свинках

Руководствуясь методическими указаниями «Вакцинопрофилактика. Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба» [49], стабильность биологических свойств испытуемого вакцинного штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* определяли после проведения 10 пассажей культуры через организм морских свинок.

Выделенную после десятого пассажа от экспериментальных животных субкультуру *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* характеризовали по культурально-морфологическим и серологическим свойствам.

Показано, что среди 100 клонов этой субкультуры, выращенной на FT-агаре, выявлено 86 колоний SR-типа и 14 колоний S-типа. Окрашивание мазков по Граму визуализировало мелкие грамотрицательные коккобактерии; окрашивание по Романовскому-Гимзе – мелкие сиреневые коккобактерии.

Культуры, приготовленные из всех 100 клонов, в пробирочной реакции агглютинации давали положительную реакцию агглютинации с сывороткой диагностической туляремийной сухой для РА с образованием крупнохлопчатого агглютината на уровне «4 креста» в титре 1:3200. При окрашивании иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими туляремийными наблюдалось специфическое свечение также на «4 креста».

Следовательно, все изученные колонии обладали типичными культурально-морфологическими и антигенными свойствами, характерными для *F. tularensis*, что свидетельствуют о стабильности биологических свойств.

В качестве одного из критериев молекулярно-генетической характеристики изученной культуры после 10 пассажей была проведена амплификация маркерных участков для подтверждения наличия делеции в гене *recA* у 20-ти произвольно отобранных клонов субкультуры *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, полученной после 10 пассажей на морских свинках.

В отобранных клонах в 100 % случаев была подтверждена делеция в гене *recA*. Это указывает на то, что пассаж культуры через организм биопробных животных не изменил генетической характеристики отобранных клонов, подтверждая, таким образом, стабильность этих биологических свойств.

5.2.5 Оценка реактогенности штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* по изменению веса морских свинок и мышей линии BALB/c

Согласно МУ 3.3.1.2161-07, для определения реактогенности исследуемых штаммов у вакцинированных морских свинок проводят оценку влияния иммунизации испытуемым и контрольным штаммами на изменение температуры и массы тела. Массу тела животного определяют с точностью до одного грамма [49].

На первом этапе исследований было изучено влияние иммунизации штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* на физиологическое состояние морских свинок (температуру и вес) в сравнении с родительским штаммом

F. tularensis 15НИИЭГ. Результаты исследований приведены на рисунках 55, 56. Очевидно, что изменения температуры при вакцинации морских свинок вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ носят характер постоянной лихорадки, свойственной инфекционному процессу (рисунок 55). Та же тенденция в динамике изменения температуры сохранялась и при вакцинации штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* (рисунок 55), не позволяя выявить закономерностей, характерных для каждого штамма.

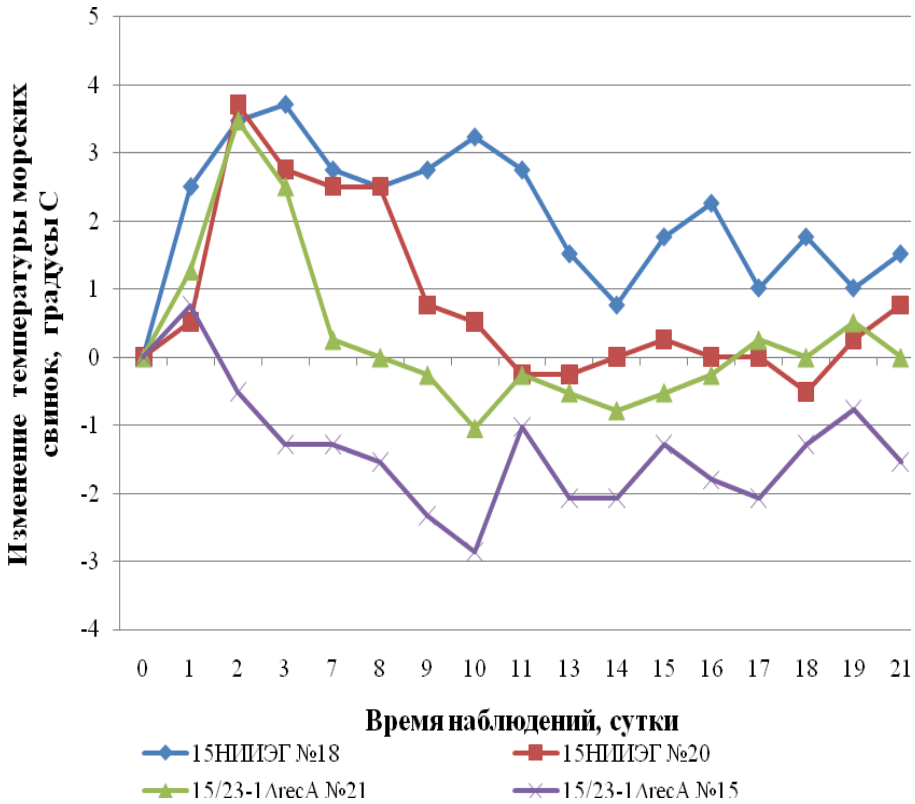


Рисунок 55 – Динамика изменения температуры морских свинок

Примечание: Показаны индивидуальные значения после вакцинации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* по отношению к первому дню иммунизации. Доза –10^9м.к. /свинку

Изучение изменения веса морских свинок, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA*, в отличие от температуры, позволило выявить определенные закономерности, свойственные каждому штамму. На рисунке 56 показаны индивидуальные изменения веса морских свинок, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15НИИЭГ (рисунок 56, животные №18 и №20) и 15/23-1Δ*recA* (рисунок 56, животные № 21 и №15). Показано, что индивидуальные кривые отдельных свинок, иммунизированных одним и тем же штаммом, практически не отличаются. Приведенные данные свидетельствуют,

что, иммунизация испытуемым штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, по сравнению с контрольным штаммом 15 НИИЭГ, вызывает значительно меньшее снижение веса свинок.

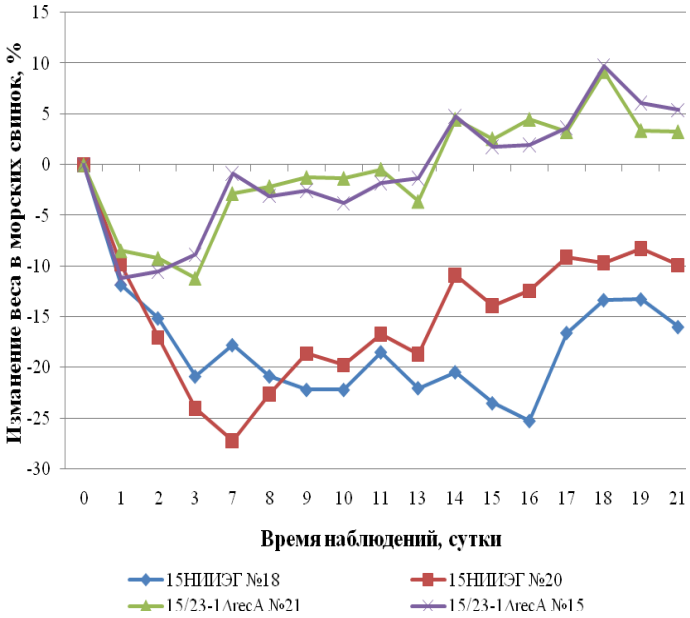


Рисунок 56 – Динамика изменения веса морских свинок

Примечание: Показаны индивидуальные значения после вакцинации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* по отношению к первому дню иммунизации. Доза –10^9м.к. /свинку

Для дополнительного подтверждения возможности использования параметров изменения веса в качестве критерия реактогенности у мышей линии BALB/c и морских свинок были проведены сравнения этих показателей у животных, иммунизированных контрольным и испытуемым штаммами *F. tularensis*. На рисунке 57 приведены усредненные результаты динамики изменения веса у морских свинок и мышей в течение 21 сут после вакцинации.

Очевидно, что в период первых пяти суток к наибольшему снижению веса (23%) приводит вакцинация морских свинок штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, затем вес постепенно повышается, однако к 21 сут вес животных еще не достигает исходных значений. Напротив, хотя у иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* морских свинок наибольшее снижение веса наблюдалось в те же сроки, однако, оно было менее выражено (10%), и уже в период 6-13 сут наблюдалось не только возвращение веса к исходным значениям, а также и дальнейшее его увеличение.

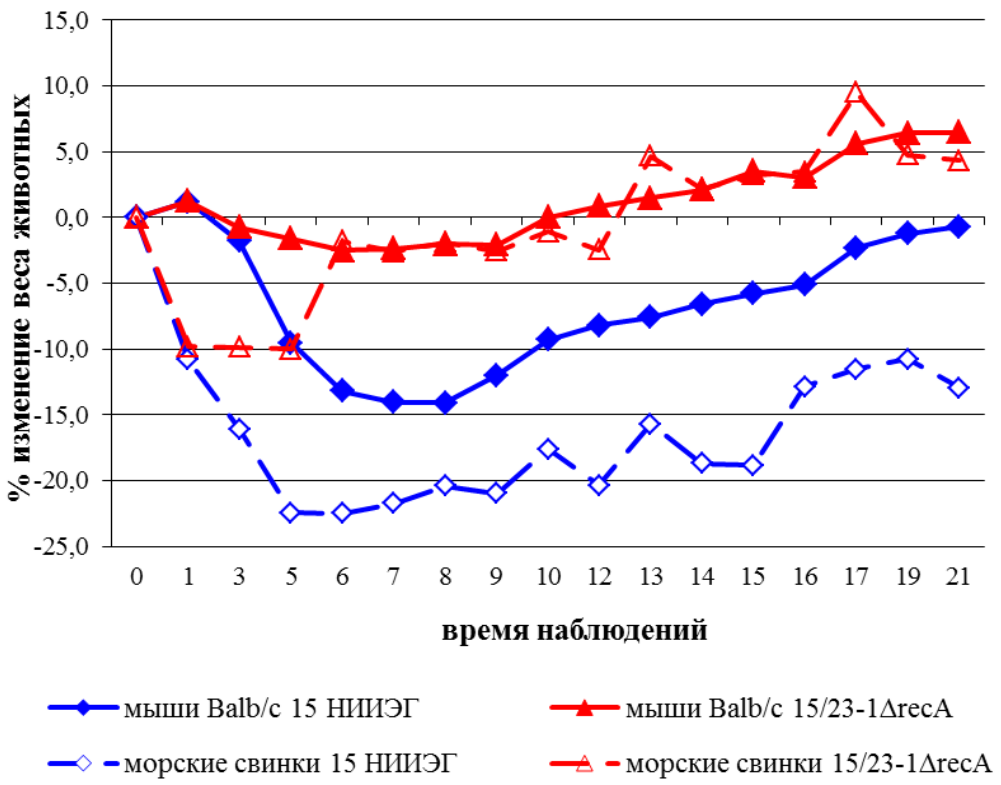


Рисунок 57 – Динамика изменения веса лабораторных животных после вакцинации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA*

Примечание: Показаны средние значения по отношению к первому дню иммунизации, доза – 10^8 м.к./свинку, 10^2 м.к./мышь.

Мыши BALB/c сходным образом реагировали на вакцинацию штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ: максимум снижения веса приходился на 8 сут, затем в период 9-21 сут вес плавно возвращался к исходному значению. В период 3-10 сут мыши BALB/c отреагировали на вакцинацию штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* незначительным снижением веса (менее 5%). К 11 сут вес животных возвратился к исходному значению и далее мыши стали прибавлять в весе.

Суммируя полученные данные, можно сказать, что изучение динамики изменения веса мышей BALB/c и морских свинок в ответ на иммунизацию штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* показало, что данный штамм, по сравнению с контрольным штаммом 15 НИИЭГ, оказывает меньшее влияние на физиологическое состояние как морских свинок, так и мышей. Следовательно, этот параметр изменения веса после иммунизации можно успешно применять для характеристики реактогенности штаммов не только при моделировании инфекции на морских свинках, но и для модели мышей линии BALB/c.

5.2.6 Оценка влияния штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* на гематологические показатели морских свинок и мышей линии BALB/c

Согласно МУ 3.3.1.2161-07, для характеристики новых туляремийных вакцинных штаммов необходимо изучить их влияние на иммунную систему морских свинок для выявления возможных иммунологических нарушений в организме животного после введения культуры исследуемого штамма. Как известно, нарушения иммунной системы могут приводить к развитию вторичного иммунодефицита, лежать в основе неполноценного специфического ответа на сам штамм, быть причиной изменений иммунной реактивности организма на другие неродственные антигены. Следует подчеркнуть, что многие из рекомендуемых МУ 3.3.1.2161-07 тестов весьма трудоемки. Кстати, изучение гематологических показателей рассматривается в аспекте вспомогательных тестов для определения количества Т- и В-лимфоцитов и фагоцитарной активности макрофагов. Ранее, в 3 главе, мы уже показали, что гематологические показатели отражают остроту воспалительных процессов и могут расцениваться в качестве дополнительных критериев реактогенности туляремйных вакцинных штаммов.

Нами были определены гематологические показатели крови морских свинок и мышей линии BALB/c в различные сроки после вакцинации штаммами 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* (доза – 10^8 м.к./свинку, 10^2 м.к./мышь). Было показано, что количество эритроцитов и уровень гемоглобина в группах животных, иммунизированных испытуемым и контрольным штаммами, не отличались (данные не приведены). Основные изменения в крови вакцинированных животных были выявлены при определении лейкоцитов и тромбоцитов (таблица 50).

На 4 сут после вакцинации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA*, согласно приведенным в таблице 50 данным, у морских свинок наблюдалась лейкопения: количество лейкоцитов снизилось в 3 и 2 раза, соответственно. К 7 сут у морских свинок, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, количество лейкоцитов постепенно увеличивалось и на 14 сут лейкопения сменилась относительным лейкоцитозом. У животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, к 7 сут количество

Таблица 50 – Динамика гематологических показателей и уровня гамма-интерферона лабораторных животных после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* (доза – 10^8 м.к./свинку, 10^2 м.к./мышь)

Показатели крови	Лабораторные животные	*F. tularensis*, штаммы	Время наблюдений				
			0 сутки	4 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Количество лейкоцитов×10^9	морские свинки	15 НИИЭГ	6,0±1,5	1,7±0,5	3,9±1,1	9,3±0,4	8,6±2,5
		15/23-1Δ*recA*	3,9±0,5	1,6±0,3	6,0±0,9	6,5±0,8	5,6±0,5
	мыши BALB/c	15 НИИЭГ	4,6±0,7	2,5±0,4	2,6±0,5	8,20±0,9	6,8±0,9
		15/23-1Δ*recA*	4,6±0,7	5,3±0,4	4,10±0,3	7,80±1,0	5,9±0,6
Количество тромбоцитов×10^9	морские свинки	15 НИИЭГ	607,8±136,1	69,5±24,5	117,0±29,6	269,5±29,6	518±212,5
		15/23-1Δ*recA*	431,8±68,2	156,0±53,8	523±182,6	442,8±69,7	377,3±110,0
	мыши BALB/c	15 НИИЭГ	562,8±34,8	385,2±83,2	241,8±58,7	892,8±173,8	789,1±71,6
		15/23-1Δ*recA*	562,8±34,8	618,5±129,7	455,8±47,4	842,7±322,4	698,2±112,1
Гамма-интерферон, пкг/мл	мыши BALB/c	15 НИИЭГ	94,1±12,9	381,6±43,3	1702,3±187,5	71,5±12,0	н/д
		15/23-1Δ*recA*	94,1±12,9	269,4±23,5	331,9±38,3	79,7±13,6	н/д

лейкоцитов вернулось к нормальному значению, сохранявшемуся в течение всего периода наблюдений.

Изменение количества лейкоцитов у мышей линии BALB/c, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, носило сходный характер с изменениями этого показателя у морских свинок – такая же выраженная лейкопения в период 4-7 сут и относительный лейкоцитоз в период 14-21 сут. У мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, лейкопении в период 4-7 сут не наблюдали, и только на 14 сут был отмечен относительный лейкоцитоз, что, вероятно, связано с менее выраженным воспалительным действием этого штамма на организм мышей.

У морских свинок на 4 сутки после вакцинации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA*, согласно приведенным данным, наблюдалась выраженная тромбоцитопения: количество тромбоцитов снизилось в 9 и 2,5 раза, соответственно. На 7-14 сут у иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ животных тромбоцитопения еще сохранялась, а у иммунизированных штаммом 15/23-1Δ*recA* животных уже на 7 сут количество тромбоцитов вернулось к норме.

У мышей линий BALB/c при вакцинации штаммами *F. tularensis* наблюдалась картина с выраженной тромбоцитопенией в период 4-7 сут с максимальным снижением на 7 сут и относительным тромбоцитозом в период 14-21 сут. Наибольший размах колебаний этого показателя наблюдали у мышей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Дополнительно на мышах линии BALB/c по изменению уровня интерферона в сыворотке экспериментальных животных была проведена оценка остроты воспалительного процесса, индуцированного иммунизацией. Данные таблицы 50 свидетельствуют, что на 7 сут уровень гамма-интерферона в сыворотке достигал максимума, превышая исходные значения в 18 раз у мышей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, и 3,5 раза у мышей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*.

Данные, приведенные выше, позволяют утверждать, что определение количества лейкоцитов и тромбоцитов, а также уровня гамма-интерферона в сыворотке дают дополнительные характеристики для вакцинных

туляремийных штаммов и действительно могут служить критерием реактогенности, поскольку относятся к общим воспалительным реакциям организма на иммунизацию. Дополнительно следует отметить, что сравнительный анализ этих показателей на морских свинках и мышах линии BALB/c позволяет считать мышиную модель адекватной.

5.2.7 Оценка формирования гуморального и клеточного иммунного ответа на штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* у морских свинок и мышей линии BALB/c

Для изучения иммуногенной активности, согласно МУ 3.3.1.2161-07, животных только иммунизируют и далее заражают вирулентным штаммом, определяя величину $ЕД_{50}$ в опытах по активной защите морских свинок. При этом оценка индуцированного специфического гуморального и клеточного иммунного ответа методами лабораторной диагностики не проводится.

Современное развитие диагностических систем позволяет на этапе вакцинации оценить клеточный и гуморальный поствакцинальный противотуляремийный иммунитет [190]. Разработка критериев специфического иммунитета против туляремии на основе показателей клеточного и гуморального иммунитета позволит предварительно оценивать потенциальные кандидаты в вакцинные штаммы и делать прогноз об их протективных свойствах.

В качестве тестов для исследования гуморального иммунитета мы предлагаем изучать иммуногенную активность кандидатов в вакцинные штаммы иммуноферментным методом, используя в качестве специфического антигена УЗД штамма *F.tularensis* 15 НИИЭГ.

О формировании клеточного иммунитета можно судить по продукции гамма-интерферона в супернатанте спленоцитов, полученных от вакцинированных мышей, культивируемых с антигенами туляремийного микроба в течение 48 ч.

Учитывая это, мы сравнили штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* по способности формировать гуморальный и клеточный иммунитет у мышей линии BALB/c и гуморальный иммунитет у морских свинок.

Животные были вакцинированы подкожно клетками штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* в дозах 10^2 м.к./для мыши и 10^8 м.к./для морской свинки. У вакцинированных морских свинок и мышей были определены титры антител к УЗД *F. tularensis* 15 НИИЭГ на 21 сут после введения вакцин (таблица 51).

Таблица 51 – Титры антител к УЗД *F. tularensis* 15 НИИЭГ у морских свинок и мышей на 21 сут после вакцинации

F. tularensis штаммы	Лабораторные животные	
	морские свинки	мыши линии BALB/c
15 НИИЭГ	1/5000 (1/1600÷1/12800)	1/400
15/23-1Δ*recA*	1/10000 (1/800÷1/25600)	1/400

Полученные данные свидетельствуют, что вакцинация штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* вызывает развитие гуморального иммунного ответа в организме экспериментальных животных. Более высокие титры антител у морских свинок обусловлены либо более высокой дозой вакцинации (10^8м.к./морскую свинку), либо различиями в иммунной системе мышей и морских свинок. Мыши линии BALB/c являются высокочувствительными животными к туляремии, поэтому даже доза вакцинации 10^2 м.к./мышь вызывает инфекционный процесс, что ослабляет развитие гуморального иммунитета.

Сравнение динамики нарастания уровня специфических антител показывает, что вакцинация штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ приводила к более раннему (на 7 сут) появлению наибольшего уровня антител к суммарному антигену туляремийного микроба в титре 1:1200 по сравнению со штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, введение которого приводило к индукции наибольших значений титров антител 1:800 на 14 сутки (рисунок 58).

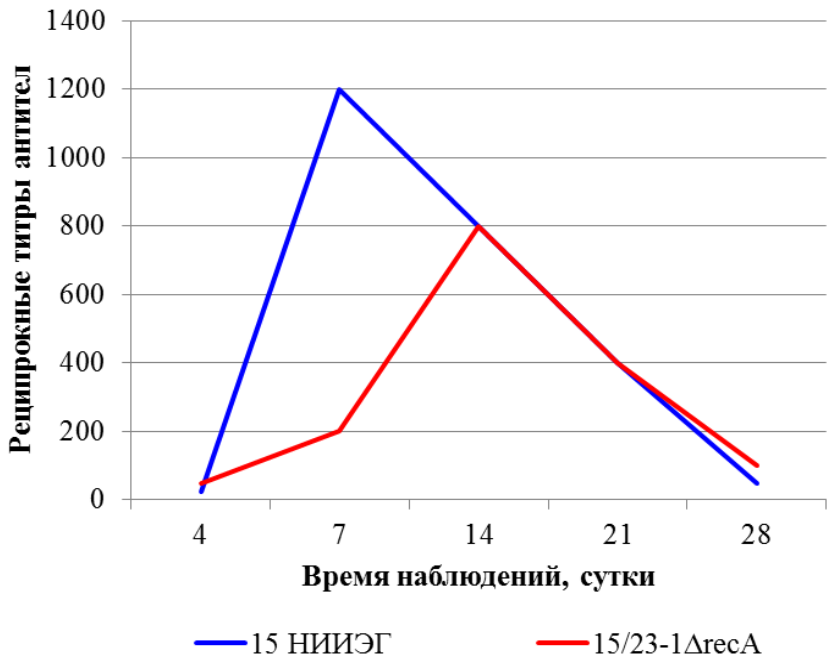


Рисунок 58 – Динамика уровня индукции специфических антител (средние значения) у мышей линии BALB/c, вакцинированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1ΔrecA

Напряженность клеточного звена иммунитета у вакцинированных мышей оценивали по продукции гамма-интерферона спленоцитами в ответ на стимуляцию антигенами УЗД штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (рисунок 59).

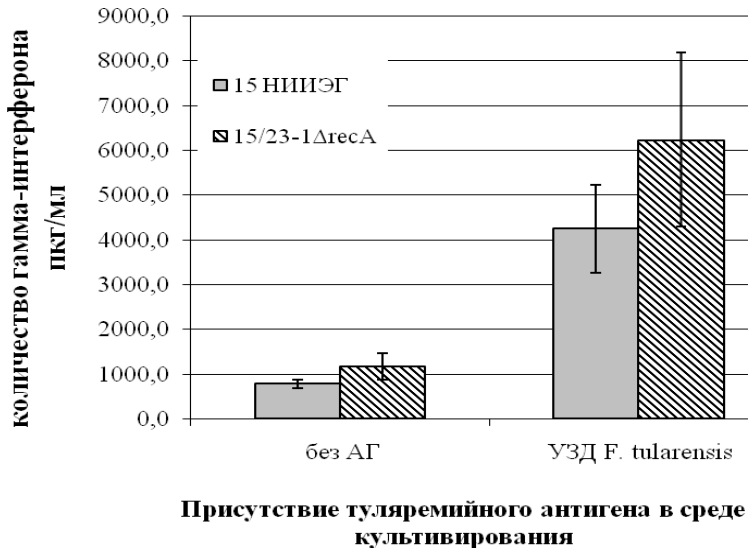


Рисунок 59 – Индуцированный синтез гамма-интерферона спленоцитами иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1ΔrecA мышей на 30 сутки после вакцинации

Продукция гамма-интерферона спленоцитами мышей в ответ на антиген позволяет судить об уровне специфического клеточного ответа на данный антиген. Полученные результаты свидетельствуют, что у мышей, вакцинированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* в дозе 1×10^2КОЕ, продукция гамма-интерферона спленоцитами в среде с УЗД туляремийного микроба достоверно превышала количество этого цитокина в среде без антигена.

Это позволяет считать, что иммунизация рекомбинантным штаммом *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA приводит к формированию специфического Т-клеточного иммунитета, не отличающегося по напряженности от иммунитета, индуцированного родительским штаммом.

5.2.8 Оценка иммуногенной активности штамма *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA для морских свинок и мышей линии BALB/c

В соответствии с методическими указаниями "Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба" [49], определение иммуногенной активности изучаемого штамма проводят на морских свинках, иммунизированных контрольным и испытуемым штаммами. Через 30 сут животных подкожно заражают 1000 DCL (5×10^3 м.к.) тест-заражающего штамма *F. tularensis* 503 голарктического подвида. Мы дополнили эти исследования мышиной моделью линии BALB/c. Мышей на 30 сут после иммунизации подкожно заражали штаммами *F. tularensis* 503 (1000 DCL) и Schu (1000 DCL) неарктического подвида. Наблюдение за животными вели в течение 21 сут, а затем определяли величину ED_{50}. Результаты определения величины ED_{50} приведены в таблице 52.

Данные, приведенные в таблице 52, свидетельствуют, что иммуногенная активность штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* сравнима с данными по иммуногенной активности родительского штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ как для морских свинок, так и для мышей линии BALB/c. Иммуногенная активность изучаемого штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* соответствует требованиям, предъявляемым к вакцинному штамму [49], согласно которым ED_{50} для морских свинок не должна превышать 1000 м.к.

Таблица 52 – Иммуногенная активность штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* для морских свинок и мышей линии BALB/c

Лабораторные животные	Штаммы *F. tularensis*	ED_{50}, м.к./животное	
		F. tularensis 503 (1000 DCL)	*F. tularensis* Schu (1000 DCL)
Морские свинки	15 НИИЭГ	12,6 (5,7÷96,5)	н/д
	15/23-1Δ*recA*	79,0 (13,8÷316)	н/д
Мыши линии BALB/c	15 НИИЭГ	8,5 (1,8÷53,7)	34,5(3,6÷97,3)
	15/23-1Δ*recA*	10,3 (3,6÷78,5)	42,3(8,6÷109,6)

Дополнительно на мышах линии BALB/c продемонстрировано, что иммунизация штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* обеспечивает защиту от инфицирования штаммом *F. tularensis* Schu на уровне родительского штамма, что свидетельствует о его выраженных иммуногенных свойствах.

5.2.9 Сравнение длительности и напряженности иммунитета у мышей линии Balb/c при иммунизации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*

Ранее было показано, что при изучении постинфекционного и поствакцинального клеточного иммунитета у людей характерна пролиферация $CD4^+$ и $CD8^+$ Т клеток, которые продуцируют IL-2 и гамма-интерферон при рестимуляции специфическим антигеном [197,198, 280, 426]. Данный иммунный ответ сохраняется длительное время (до 25 лет) [198]. Специфические антитела, т.е. гуморальный иммунитет, присутствовали в организме людей, переболевших туляремией, до 8 лет [121, 198]. Безусловно, эти данные очень интересны, но их трудно моделировать на животной модели ввиду относительно небольшой длительности жизни лабораторных животных. Учитывая важность этой характеристики нового вакцинного штамма, мы сравнили динамику изменения иммунологических параметров и протективности штаммов в течение шести месяцев после иммунизации.

Мышей линии BALB/c по 15 мышей в группе однократно подкожно иммунизировали штаммами *F.tularensis* 15НИИЭГ и 15/23-1ΔrecA в дозе

50 м.кл/мышь. Через 30, 60, 90, 120, 150, 180 сут после иммунизации по пять мышей из каждой группы эвтаназировали для получения сыворотки крови (для исследования гуморального иммунитета) и выделения спленоцитов из селезенок (для оценки клеточного звена иммунитета). Оставшихся экспериментальных животных заражали вирулентными штаммами *F.tularensis* 503 и Schu.

На рисунке 60 представлены графики изменения титров специфических антител к антигенам УЗД *F. tularensis* мышей, иммунизированных вакцинными штаммами через 30, 60, 90, 120, 150, 180 сут после иммунизации

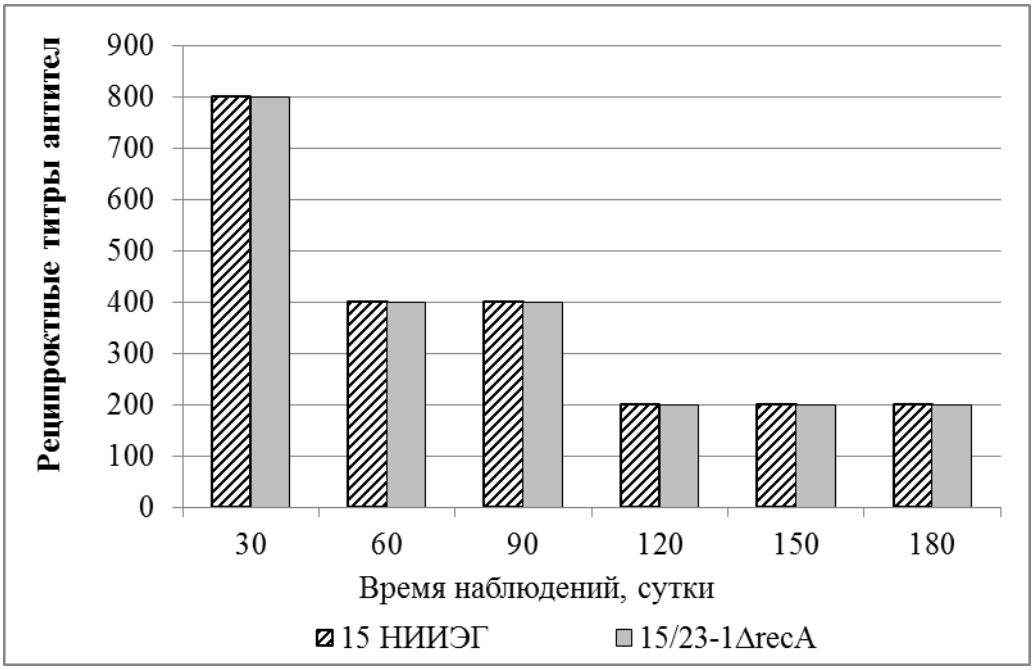


Рисунок 60 – Динамика уровня индукции специфических антител (средние значения) у мышей линии BALB/c, вакцинированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1ΔrecA

Как видно из представленных данных, самые высокие титры антител к антигенам УЗД *F. tularensis* (1:800) выявлялись на 30-е сут после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15НИИЭГ или *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA. Затем происходило снижение титров до 1:400 на 60-ые и 90-ые сут после иммунизации и до 1:200 на 120-е, сохранявшееся вплоть до 180-х сут иммуногенеза.

Для определения клеточно-опосредованного ответа использовали и определение IFN-γ в супернатанте лимфоцитов, культивируемых со специфическими антигенами.

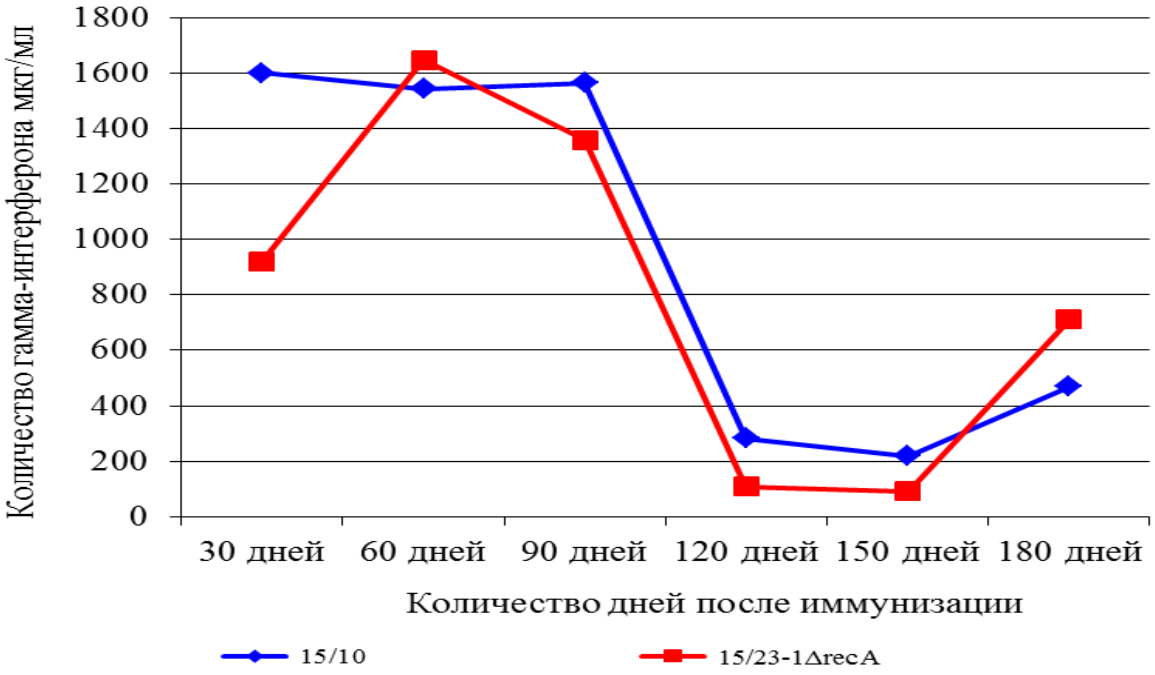


Рисунок 61 – Динамика уровня синтеза гамма-интерферона в супернатанте спленоцитов в присутствии антигенов УЗД в среде культивирования в зависимости от времени после иммунизации.

Представленные на рисунке 62 результаты свидетельствуют, что иммунизация мышей обоими штаммами *F. tularensis* 15НИИЭГ и 15/23-1ΔrecA вызывает повышение уровня секреции гамма-интеферона спленоцитами иммунных мышей в период с 30-х по 90-е сут, на 120-е и 150-е сут отмечено резкое падение синтеза этого цитокина спленоцитами, а на 180-е отмечается некоторый подъем. Возможно, что до 90 дня эффективность защиты обеспечивается активацией пула цитотоксических лимфоцитов, а затем появляются Т-хелперы, распознающие специфические рецепторы (клетки памяти), которые играют главную роль в длительной защите.

Для определения эффективности защиты мышей заражали подкожно вирулентными штаммами *F. tularensis* Schu и 503 в дозе 1000 DCL и

рассчитывали процент выживших животных в каждой группе. Результаты представлены в таблице 53

Данные таблицы показывают, что иммунизация штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* вплоть до 90 дня 100% эффективно защищает от заражения вирулентным штаммом 503 *F. tularensis* subsp. *holarctica*. На 120-й и 150-й наблюдали небольшое снижение (20%) уровня иммунной защиты при иммунизации штаммом 15 НИИЭГ и сохранения 100% защиты при иммунизации штаммом 15/23-1ΔrecA.

Таблица 53 –Выживаемость мышей после заражения штаммами *F. tularensis* Schu и 503 в различные сроки после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1ΔrecA

Сроки после иммунизации, сут	*F. tularensis*, штаммы			
	503		Schu	
	15 НИИЭГ	15/23-1Δ*recA*	15 НИИЭГ	15/23-1Δ*recA*
0 (контроль)	0	0	0	0
30	100	100	100	100
60	100	100	60	80
90	100	100	40	75
120	80	100	0	0
150	80	100	20	40
180	100	100	40	40

Данные таблицы показывают, что иммунизация штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/23-1Δ*recA* вплоть до 90 дня 100% эффективно защищает от заражения вирулентным штаммом 503 *F. tularensis* subsp. *holarctica*. На 120-й и 150-й наблюдали небольшое снижение (20%) уровня иммунной защиты при иммунизации штаммом 15 НИИЭГ и сохранения 100% защиты при иммунизации штаммом 15/23-1ΔrecA.

Для штамма *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu неарктического подвида 100% эффективная защита наблюдается в течение первых 30 суток после иммунизации, после чего она снижается и к 120 дню защита не эффективна (таблица53).

Факт эффективной защиты на 180 сутки после иммунизации – для штамма 503 – это 100% выживаемость животных, иммунизированных как штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ, так и штаммом 15/23-1Δ*recA*, и даже 40% эффективная защита при заражении вирулентным штаммом Schu, требуют дальнейших исследований в данном направлении.

5.3 Обсуждение результатов

В этой главе было проведено сравнение свойств полученного нового штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* с исходным вакцинным штаммом 15 НИИЭГ параллельно на морских свинках и мышах линии BALB/c. Убедительно показано, что результаты, полученные на морских свинках, коррелируют с результатами, полученными на мышах. Установлено, что новый штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* действительно обладает, по сравнению с родительским штаммом, сниженной реактогенностью и большей стабильностью, а иммуногенная активность сохранена на уровне родительского штамма.

Одним из основных направлений современной вакцинологии является поиск и разработка живых вакцин со сниженной реактогенностью. В связи с большим количеством поствакцинальных осложнений необходимость разработки дополнительных критериев оценки реактогенности вакцинных штаммов очевидна. Например, Н.П. Хирина с соавт. (2011) показали, что иммунизация аутбредных мышей живой туляремийной вакциной приводит к изменению уровня синтеза NO [92]. Изменения со стороны системы NO, по их мнению, может служить важной характеристикой безвредности и безопасности используемых в настоящее время средств специфической профилактики инфекций.

Современный уровень лабораторных исследований, наличие гематологических анализаторов для ветеринарии, наборов для определения уровня цитокинов позволяют расширить спектр параметров для оценки реактогенности.

Проведенная сравнительная оценка применяемой вакцины *F. tularensis* 15 НИИЭГ и разрабатываемого штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* подтверждает, что в целом изменение исследуемых параметров, а именно: приживаемости штамма, остаточной вирулентности, динамики изменения веса и гематологических показателей, у морских свинок и мышей имеет сходный характер, что позволяет считать мышиную модель экспериментальной туляремии адекватной. Важно отметить, что для изучения реактогенности вакцинных штаммов мышиная модель может считаться предпочтительной, поскольку введение при иммунизации даже небольших доз штаммов приводит к развитию инфекционного процесса. Сравнение остроты воспалительных реакций, возникающих после введения контрольных и испытуемых вакцин, дает возможность проведения предварительной оценки реактогенности кандидат-вакцин.

Сравнительная характеристика вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и рекомбинантного 15/23-1Δ*recA* с использованием двух биологических моделей показала, что, хотя организм животных быстрее освобождается от бактериальных клеток штамма *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, тем не менее, вакцинация этим штаммом приводит к формированию напряженного иммунного ответа на уровне родительского штамма. После введения этой вакцины снижение веса, отражающее поствакцинальные морфо-функциональные изменения в организме животных, было менее выражено. В первую неделю после вакцинации нами были выявлены лейкопения и тромбоцитопения у обоих видов экспериментальных животных, причем изменения этих параметров также были менее выражены у животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*. Оценка остроты воспалительного процесса, индуцированного вакцинацией, по изменению уровня интерферона в сыворотке мышей, а также суммарный анализ всех полученных данных позволяет сделать вывод о том, что *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* обладает менее выраженной реактогенностью по сравнению с вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Следовательно, задача по получению вакцинного штамма с меньшей степенью реактогенности успешно выполнена.

Изучение гуморального звена иммунитета у мышей линии BALB/c после иммунизации рекомбинантным штаммом *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* и исходного вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ свидетельствуют, что титры специфических антител в сыворотках мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИИГ и 15/23-1ΔrecA в дозе 50-100 м.к./мышь имеют сходные значения. При изучении длительности гуморального иммунитета у мышей, иммунизированных этими штаммами, в разные сроки после иммунизации (30, 60, 90, 120, 150, 180 сут), было показано, что иммунизация мышей штаммом *F.tularensis* 15/23-1Δ*recA* приводит к выраженному синтезу антител к антигенам *F.tularensis* на протяжении всего периода наблюдений. Самые высокие титры антител к УЗД *F. tularensis* (1:800) выявлялись на 30-е сут после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*. Затем происходило медленное снижение титров до 1:400 на 60-ый и 90-ый день после иммунизации и до 1:200 в период 120-180-е сут. Уровни антител были сопоставимы с титрами антител к антигенам УЗД *F. tularensis* у животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Изучение клеточного звена иммунитета проводили у мышей линии BALB/c, вакцинированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*. Было показано, что иммунизация новым разработанным штаммом приводит к формированию клеточного иммунитета, сопоставимого с показателями клеточного иммунитета, обеспечиваемого вакцинным штаммом 15 НИИЭГ. При изучении клеточно-опосредованного иммунитета в длительном эксперименте (продолжительностью 180 дней) штаммы *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* и 15 НИИЭГ не отличались ни по срокам, ни по уровню активности. Было показано, что наиболее высокий уровень продукции гамма-интерферона наблюдали в период 30-90-е сут после иммунизации, на 120-е и 150-е сутки наблюдали резкое падение и некоторый подъем на 180-е сут. Эти данные коррелируют с эффективностью защиты при заражении вирулентными штаммами на 30-е, 60-е, 90-е сут: для штамма

503 – это 100%, а для штамма Schu – это от 40 до 100% при иммунизации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, и от 75 до 100% при иммунизации 15/23-1Δ*recA*. На 120-е сут наблюдали наиболее низкие значения как показателей клеточно-опосредованного иммунитета, так и протективной защиты мышей *in vivo*. Феномен повышения эффективности защиты на мышах *in vivo* и продукции гамма-интерферона спленоцитами в ответ на специфический антиген *in vitro* на 180-е сут после иммунизации свидетельствует, возможно, о преимущественном участии на ранних сроках после иммунизации цитотоксических лимфоцитов, а в более отдаленные сроки главными участниками, обеспечивающими клеточно-опосредованный иммунитет, становятся Т-хелперы, распознающие специфические рецепторы (клетки памяти). Этот процесс характерен в равной степени для обоих штаммов.

Таким образом, созданный нами новый вакцинный штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA*, обладающий сниженной реактогенностью, может рассматриваться в качестве перспективной туляремийной кандидат-вакцины, а проведенные исследования по изучению свойств нового вакцинного штамма *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA позволяют сделать следующие выводы:

- Созданный штамм *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA обладает сниженной реактогенностью и может рассматриваться в качестве перспективной кандидат-вакцины против туляремии.
- Наряду с морскими свинками, для изучения реактогенности потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы против туляремии можно использовать мышей линии BALB/c, что экономически более выгодно.
- Степень реактогенности потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы против туляремии целесообразно оценивать по динамике изменения веса, гематологическим показателям и уровню гамма-интерферона в сыворотке мышей.
- Изучение длительности и напряженности иммунитета на мышиной модели экспериментальной туляремии при изучении новых вакцинных штаммов может являться их дополнительной характеристикой.

Глава 6 АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ ШТАММОВ *F. TULARENSIS* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КАНДИДАТОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ УЛУЧШЕНОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ

Данная глава посвящена разработке нового алгоритма скрининговой оценки потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis,* созданных с помощью молекулярно-генетических методов, на основании анализа комплекса полученных нами данных.

Существующий в настоящее время порядок оценки свойств вакцинных штаммов туляремии изложен в методических указаниях "Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба" [49]. В нашем Центре в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2014 годы)» ведется работа над созданием новых штаммов *F. tularensis*, которые могут рассматриваться в качестве кандидатов в вакцинные препараты против туляремии. Как уже упоминалось ранее, при разработке новых вакцинных препаратов против туляремии главными задачами являются, прежде всего, снижение реактогенности, повышение стабильности, внесение генетических маркеров в геном существующей вакцины при сохранении её высокой иммуногенности. Кроме того, ведется целенаправленная работа по созданию штаммов, способных защищать от аэрозольного заражения природными штаммами голарктического и неарктического подвидов. При получении новых штаммов существует постоянная необходимость проверки большого числа получаемых генетически детерминированных мутантов. При скрининговой проверке штаммов не всегда целесообразно проводить полный объём исследований, изложенных в МУ 3.3.1.2161-07. Это экономически очень затратно, к тому же биоэтические нормы, принятые во всем мире, требуют минимизации количества животных, привлекаемых к исследованиям.

6.1 Использование клеточной линии J774.1A на первом этапе исследований кандидат-вакцин

При разработке новых лекарственных и вакцинных препаратов в настоящее время широко используются методы исследований, заменяющие

животных в эксперименте. При изучении лекарственных препаратов это дает возможность целенаправленно изучать их действие на конкретные мишени. Например, в работах I. Golovliov с соавторами при изучении мутантных по гену *iglC* штаммов LVS была использована макрофагоподобная клеточная линия J774.1A [236]. Исследователи широко используют эту клеточную линию и подобную ей линию RAW264.7 при изучении влияния некоторых факторов патогенности чумного и сибиреязвенного микробов. Поскольку туляремийный микроб является классическим внутриклеточным патогеном, не способным к размножению во внешней среде, нам кажется целесообразным рекомендовать проведение изучения способности потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы к размножению внутри эукариотических клеток, в частности, в профессиональных фагоцитах, с использованием клеточных линий.

Как показано нами в главе 5, изучение влияния некоторых генов на процесс фагоцитоза с использованием клеточных линий позволяет делать предварительные заключения о перспективности создаваемых рекомбинантных штаммов. Полученные нами результаты показали, что данные по фагоцитозу коррелируют с данными по приживаемости штаммов в организме мышей линии BALB/c и с данными по остаточной вирулентности. В 6 главе мы показали, что новый потенциальный вакцинный штамм *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* в 8-10 раз хуже размножался в клетках J774.1A, чем исходный штамм, тем не менее, сохранял способность к размножению. При сравнении эффективности фагоцитоза бактерий перитонеальными мышиными макрофагами было показано, что, в отличие от клеток линии J774.1A, различия между штаммами практически отсутствовали, что говорит о преимуществе использования для оценки этого параметра клеточных макрофагоподобных линий. Данные по способности к переживанию и размножению бактериальных клеток *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* в эукариотических клетках J774.1A также согласуются с данными по приживаемости и остаточной вирулентности этого штамма для экспериментальных животных.

Таким образом, на первоначальном этапе изучения штаммов − потенциальных кандидатов в вакцинные − целесообразно проводить изучение процесса фагоцитоза на клетках линии J774.1A. Этот этап необходим в исследовательской работе при получении новых штаммов и выборе клонов, поскольку позволяет избежать использования большого количества мышей для оценки остаточной вирулентности и приживаемости штаммов. С нашей точки зрения, таким этапом можно дополнить и МУ 3.3.1.2161-07, чтобы в основных требованиях к штамму обязательным параметром характеристики штамма кандидат-вакцины стала оценка способности бактерий к размножению в макрофагоподобных клетках.

6.2 Использование динамики изменения веса и гематологических показателей мышей линии BALB/c в качестве критериев реактогенности потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы

Результаты наших исследований показали, что изучение динамики изменения веса, как одного из критериев реактогенности потенциальных вакцинных штаммов, можно проводить не только на морских свинках, но и с использованием мышиной модели. Кроме того, дополнительно мы изучали влияние различных доз вакцинации штаммом *F. tularensis* 15Δ*recD* в диапазоне $10^2 \div 10^5$ КОЕ/мышь (данные не показаны). Было показано, что изменение веса мышей носит дозозависимый характер и зависит от остаточной вирулентности, что дополнительно подтверждает возможность использования этого показателя в качестве критерия оценки реактогенности.

Показано также, что, в зависимости от степени аттенуации штамма *F. tularensis* (глава 4), степень изменения гематологических показателей (лейкоцитов, тромбоцитов, гамма-интерферона) у мышей варьирует. Более вирулентный для мышей штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, вызывает более выраженный уровень изменений гематологических показателей – лейкопению, сменяющуюся относительным лейкоцитозом, тромбопению, носящую более выраженный характер, повышение активности гамма-интерферона в 18 раз. А у мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15/23-1 и 15Δ*recA*, лейкопении не наблюдали, и лейкоцитоз был кратковременным и незначительным. Та же картина наблюдалась и с

тромбоцитами: штаммы *F. tularensis* 15/23-1 и 15ΔrecA вызывали менее выраженные изменения, чем вакцинация штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Повышение уровня гамма-интерферона в сыворотке, свидетельствующее об остроте воспалительного процесса у мышей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, было почти в 10 раз выше, чем при иммунизации штаммом *F. tularensis* 15Δ*recD,* и в 6-7 раз выше, чем при иммунизации штаммами *F. tularensis* 15/23-1 и 15Δ*recA*.

Согласно МУ 3.3.1.2161-07, изучение гематологических показателей рекомендовано для изучения иммунного статуса вакцинированных животных. Мы предлагаем включить эти показатели для характеристики реактогенности штаммов. Эти показатели можно исследовать как на мышах, так и на морских свинках.

Кроме того, мы предлагаем проводить изучение динамики изменения веса мышей в течение 15 дней после вакцинации, определять количество лейкоцитов, тромбоцитов и гамма-интерферона у мышей линии BALB/c (или морских свинок) в течение 21 дня после иммунизации (на 4, 7, 14 и 21 сутки), а также рекомендовать изучение этих параметров для оценки реактогенности вакцинных штаммов.

6.3 Определение специфического иммунитета с использованием комплексного туляремийного антигена (УЗД) *F. tularensis* 15 НИИЭГ в качестве критерия иммуногенности потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы

Современное развитие диагностических систем позволяет на этапе вакцинации оценить клеточный и гуморальный постинфекционный и поствакцинальный противотуляремийный иммунитет. Разработка критериев специфического иммунитета против туляремии на основе показателей клеточного и гуморального иммунитета позволит предварительно оценивать потенциальные кандидаты в вакцинные штаммы и делать прогноз об их протективных свойствах.

В качестве тестов для исследования гуморального иммунитета мы предлагаем изучать иммуногенную активность кандидатов в вакцинные

штаммы иммуноферментным методом, используя в качестве специфического антигена туляремийного микроба – УЗД *F. tularensis* 15НИИЭГ.

Для оценки клеточного иммунитета мы предлагаем определять активность гамма-интерферона в супернатанте спленоцитов, полученных от вакцинированных мышей, культивируемых с антигеном туляремийного (УЗД) микроба в течение 48 ч.

В 4 и 5 главах показано, что на формирование гуморального и клеточного иммунитета влияет остаточная вирулентность вакцинных штаммов. Иммунизация штаммами *F. tularensis* 15/23-1, 15Δ*recA* или 15/23-1Δ*recA* приводит к формированию как гуморального, так и клеточного иммунитета, сравнимого по напряженности с клеточным иммунитетом, который формируется при вакцинации исходным штаммом 15НИИЭГ. В то же время, иммунизация штаммами *F. tularensis* 15/23-2 или 15Δ*recD* приводит к формированию менее выраженного специфического иммунитета. Эти результаты позволяют предварительно оценивать напряженность иммунитета при вакцинации мышей линии BALB/c одной дозой изучаемых штаммов и дают основание для предварительной оценки их защитных свойств. Мы считаем целесообразным внести в основные требования к новым вакцинным туляремийным штаммам, изложенные в МУ 3.3.1.2161-07, дополнительный этап по изучению параметров специфического гуморального и клеточного иммунитета.

6.4 Обсуждение результатов

В этой главе мы рассмотрели некоторые подходы, которые, на наш взгляд, могли бы ускорить и оптимизировать скрининговые исследования по изучению свойств вновь создаваемых вакцинных туляремийных штаммов. Некоторые из них уже используются исследователями при изучении туляремийного микроба, в частности, способность к размножению в клетках макрофагальных клеточных линий [236], изучение клеточного иммунитета по активности гамма-интерферона в супернатанте спленоцитов вакцинированных животных [396], изучение динамики снижения веса мышей при заражении вирулентным туляремийным штаммом [396]. Мы посчитали

целесообразным при изучении потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы использовать эти показатели комплексно, сформировав определенный алгоритм, и соотнести эти исследования с методическими указаниями "Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба" [49].

Мы предлагаем упрощенный алгоритм проведения исследований свойств новых вакцинных штаммов *F. tularensis*, что позволит снизить количество животных, необходимых для их проверки. Уже на первоначальных этапах можно выявлять не перспективные варианты потенциальных кандидатов в вакцинные штаммы, использовать меньшее количество животных, заменить более дорогих и крупных животных, таких, как морская свинка, на более экономичную мышиную модель.

Рисунок 62 – Алгоритм отбора кандидатов в вакцинные штаммы туляремийного микроба

Анализ данных, полученных при сравнительной характеристике штаммов *F. tularensis* с разной степенью аттенуации и развернутые исследования кандидат-вакцины *F. tularensis* 15/23-1Δ*recA* в сравнении с

существующей туляремийной вакциной *F. tularensis* 15 НИИЭГ позволили нам разработать алгоритм отбора кандидатов в вакцинные штаммы туляремийного микроба с использованием мышиной модели, который приведен на рисунке 62.

Таким образом, исследование кандидатов аттенуированных штаммов *F. tularensis* в вакцинные складывается из следующих этапов (рисунок 62):

1. Изучение свойств кандидатов в вакцинные штаммы в экспериментах *in vitro*.

1.1 Изучение ростовых свойств бактерий и их чувствительности к нормальной кроличьей сыворотке (НКС).

1.2. Изучение стабильности биологических свойств созданного штамма.

1.3. Изучение способности бактериальных клеток *F. tularensis* к размножению в цитоплазме макрофагов на модели мышиных макрофагоподобных клеток J774.1A.

Если исследуемый штамм обладает необходимой способностью к росту, стабилен при пересевах, устойчив к НКС и сохраняет способность к внутриклеточному размножению в макрофагах, то его используют в дальнейших исследованиях на мышах линии BALB/c.

2. Изучение иммунобиологических свойств кандидатов в потенциальные вакцинные штаммы на мышиной модели *in vivo*.

2.1. Определение остаточной вирулентности штамма по величине LD_{50} при подкожном введении.

2.2. Определение показателей реактогенности.

2.2.1. Оценка динамики веса животных после вакцинирования.

2.2.2. Гематологические показатели реактогенности.

2.2.2.1 Определение количества лейкоцитов и тромбоцитов.

2.2.2.2. Определение количества провоспалительных цитокинов в сыворотке крови.

2.3. Определение показателей иммуногенности.

2.3.1. Определение уровня гуморального иммунитета у мышей, иммунизированных исследуемым штаммом, по титру антител в сыворотке крови после иммунизации.

2.3.2. Определение уровня клеточного иммунитета по количеству гамма-интерферона в супернатанте спленоцитов иммунизированных мышей, индуцированных суммарным туляремийным антигеном.

2.4. Оценка приживаемости исследуемого штамма *F. tularensis* по степени обсемененности органов.

3. Определение протективных свойств исследуемых штаммов после заражения вирулентным штаммом *F. tularensis.*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие современных генетических методов диагностики, а также совершенствование методик конструирования штаммов с заранее заданными свойствами для специфической профилактики инфекционных болезней невозможно без разработки новых молекулярно-генетических подходов к исследованию патогенов. Использование таких подходов в исследованиях *F. tularensis* не только позволило приобрести новые знания об этом возбудителе, но и разработать принципиально новые подходы для эпидемиологической и клинической генодиагностики, проводить направленный мутагенез для установления генетических детерминант, определяющих патогенные и иммуногенные свойства этого микроорганизма, а также получать аттенуированные штаммы с заданными свойствами.

Генодиагностика позволила значительно повысить эффективность выявления, наиболее полно охарактеризовать возбудителя туляремии и значительно уменьшить время получения результатов. До начала наших работ коммерческих генодиагностических тест-систем для выявления возбудителя туляремии не было создано. Разработанная нами тест-система «MULTI-FLU», позволяющая провести одномоментную индикацию возбудителей *Y. pestis*, *B. anthracis* и *F. tularensis*, обладает, как показали медицинские испытания, высокой чувствительностью и специфичностью. Она не только позволяет дифференцировать этих возбудителей независимо от их плазмидного профиля, но, кроме того, выявить именно патогенные подвиды *F. tularensis*, дифференцируя их от *F. tularensis* subsp. *novicida*, не представляющего эпидемиологической опасности.

Для внутривидовой экспресс-диагностики возбудителя туляремии нами разработана модифицированная тест-система с одновременным использованием праймера Chi1f и праймеров iglC340F/iglC340R с зондом iglC-RT-(Cy5), которая позволяет с высокой надежностью проводить одновременную индикацию *F. tularensis* и определение подвидовой принадлежности исследуемого штамма. Данную тест-систему, в частности,

применяли для характеристики штаммов туляремийного микроба, выделенных на территории Алтая. Полученные результаты были подтверждены MLVA25-типированием и позволили отнести эти штаммы к *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, что является первым в мировой научной практике фактом выявления данного подвида за пределами Средней Азии.

Установление факта циркуляции на территории Российской Федерации подвида *mediasiatica*, который, как считалось ранее, географически обособлен и встречается только в отдельных природных очагах Средней Азии, позволило нам предложить новую эволюционную модель происхождения *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. Выдвинутая нами гипотеза эволюционной модели появления и распространения среднеазиатского подвида предполагает, что *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* возник от проникшего из Америки в Евразию *F. tularensis* subsp. *tularensis* (что могло произойти до последнего исчезновения Берингова перешейка 10-11 тысяч лет назад [356, 82]). Этот предковый микроорганизм, мигрируя на запад, снизил вирулентность и уменьшил лактамазную активность, и по этим признакам в настоящее время относится к подвиду *mediasiatica*. Алтайская популяция *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* в этом случае, вероятно, является эволюционно более древней, чем среднеазиатская, так как локализована значительно восточнее. Для подтверждения нашей гипотезы требуется проведение работ по выделению природных штаммов в Котловине Больших Озер в Монголии, окрестностях оз. Улюнгур в КНР и Балхаш-Алакюльской низменности в Казахстане, и последующего анализа подвидовой принадлежности изолятов *F. tularensis*, если они будут обнаружены.

Методы «MULTI-FLU» и Chi1f-типирование нацелены на решение вопросов дифференциальной лабораторной диагностики и позволяют в сжатые сроки определить видовую и подвидовую (для туляремийного микроба) принадлежность возбудителя. Задачей эпидемиологического расследования является также определение штаммовой принадлежности возбудителя, что позволяет установить источник инфекции и пути ее

распространения. Для этих целей широко применяется анализ вариабельных нуклеотидных тандемных повторов. При проведении MLVA25-типирования 159 штаммов туляремийного микроба, представленных в ГКПМ «Оболенск», нами было идентифицировано 127 индивидуальных генотипов. Для снижения трудозатратности и, следовательно, времени анализа нами был подобран набор из 17 локусов, позволяющий в полной мере сохранить разрешающую способность метода. MLVA17 был применен нами в ходе расследования вспышки туляремии в г. Ханты-Мансийске. Наши данные показали высокую генетическую однородность штаммов, поступивших из одного очага, что согласуется с положением о клональной структуре популяции возбудителя туляремии, и позволили выявить общий источник заражения людей и грызунов, что внесло определенный вклад в эпидрассследование.

Применение метода MLVA позволило нам выявить общие особенности у трех штаммов: двух штаммов подвида *holarctica* - Japonski Downs, 0/284, и одного штамма подвида *tularensis* - Nevada 14. MLVA-профили всех этих штаммов несли в себе черты как голарктического, так и неарктического подвидов. Эта филогенетическая группа, названная нами Nevada, позволила предположить возможность существования эволюционно древней ветви *F. tularensis*, которая представляет собой переходную форму между подвидами *tularensis* и *holarctica*.

На территории Южной Сибири нами выделена генетически обособленная южно-сибирская популяция *F. tularensis* subsp. *holarctica,* которая вошла в состав одного кластера. Этот кластер представлен двумя достаточно далеко географически отстоящими друг от друга ареалами – Иркутским и Барнаульским. Мы считаем, что на огромной территории Южной Сибири существуют “белые пятна” вследствие недостаточной представленности штаммов туляремийного микроба из-за ее малонаселенности. Продолжение работ по выделению и генотипированию

новых изолятов с территории Южной Сибири в будущем поможет расширить знания в области микроэволюции *F. tularensis*.

Другим направлением наших исследований было изучение молекулярно-генетических основ патогенности и иммуногенности туляремийного микроба. Эти исследования были направлены на разработку стратегии создания новых вакцинных штаммов *F. tularensis*. Магистральный путь получения таких штаммов – направленный мутагенез целевых генов *F. tularensis*. Основным методом направленного мутагенеза является замена генетических детерминант генома хозяина на видоизмененные детерминанты, введенные в него с помощью того или иного вектора в ходе процесса рекомбинации. Ранее были предложены методы делеции генов или фрагментов генов в туляремийном микробе в результате аллельного обмена. В этих методах модифицированный фрагмент генома переносили в клетки *F. tularensis* посредством межвидовой мобилизации рекомбинантных плазмид, созданных на базе плазмидного вектора pPV [233], либо с помощью трансформации рекомбинантных плазмид, содержащих репликон плазмиды pFNL10 с *ts*-мутацией гена *repA* [331].

Нами сконструирован суицидный вектор pGM5 для аллельного обмена. Преимуществом плазмиды pGM5 является ее способность напрямую трансформировать клетки *F. tularensis*, что значительно упрощает методику эксперимента, а также позволяет вводить рекомбинантные плазмиды в виде лигазной смеси, минуя промежуточный этап сборки в клетках кишечной палочки.

Для изучения генетических основ биохимических различий подвидов туляремийного микроба был создан ее усовершенствованный вариант – плазмида pGM6. Созданные суицидные плазмиды pGM5 и pGM6 позволили повысить эффективность сайт-направленного мутагенеза в туляремийном микробе. С их использованием нами были получены штаммы с делетированными генами *qseC*, *purMCDN*, *recA*, *recD*, *iglC* (одной и двух копий), *bla1*, *bla2* и *bla3*.

Инактивацию генов *qseC*, *purMCDN*, *recA*, *recD*, *iglC* (одной и двух копий) мы проводили с целью улучшения свойств существующего вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Было показано, что инактивация гена *qseC* приводит к потере устойчивости к бактерицидному действию нормальной кроличьей сыворотки, снижению способности размножаться в макрофагах и полной потере вирулентности для мышей. Вакцинный штамм с данной мутацией терял способность продуцировать типичный для *F. tularensis* ЛПС S-формы.

Установлено, что делеция генов *purMCDN* приводит к полной потере вирулентности и очень низкой иммуногенности для мышей. Способность размножаться в макрофагоподобных клетках сохраняется только при добавлении в среду культивирования пуринов.

Удаление обеих копий гена *iglC* приводит к полной потере вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ вирулентности и протективности для мышей.

Делеция генов *recA* и *recD* приводит к репрессии механизма рекомбинации и повышает стабильность штаммов. Инактивация гена *recD* изменяет ростовые свойства штамма, значительно снижает вирулентность и протективность.

Удаление одной копии гена *iglC* и делеция гена *recA* снижает вирулентность, сохраняя иммуногенные и протективные свойства. Таким образом, изучение аттенуированных штаммов *F. tularensis* 15Δ*qseC*, 15Δ*purMCDN*, 15/23-1, 15/23-2, 15Δ*recA* и 15Δ*recD* позволило нам сделать выводы, что для улучшения свойств существующей туляремийной вакцины, в частности, для снижения ее реактогенности и повышения стабильности наиболее рационально создать на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ штамм с делецией одной копии гена *iglC* и гена *recA* - штамм 15/23-1ΔrecA.

Подвидовые особенности метаболизма *F. tularensis,* являющиеся основными критериями подвидовой дифференциации, могут быть связаны с множеством генетических причин, однако до сих пор не были установлены

генетические детерминанты, определяющие биохимические различия подвидов *F. tularensis.* Используя анализ *in silico* аннотированных в базе NCBI геномов *F. tularensis,* а также прямое секвенирование интересующих нас участков геномной ДНК штаммов туляремийного микроба, представленных в коллекции «ГКПМ-Оболенск», мы изучили генетические детерминанты, определяющие такой диагностически важный биохимический признак, как лактамазную активность.

У всех изученных штаммов *F. tularensis* выявлено три гена *bla1, bla2 и bla3*, кодирующих металло-β-лактамазу Bla1, и две сериновые β-лактамазы - Bla2 и Bla3, соответственно, а также ген *ars*, кодирующий фермент арилсульфатазу, содержащую домен, характерный для металло-β-лактамаз. Показано, что состав этих генов, их последовательность, расположение в геноме практически идентичны у всех штаммов *F. tularensis.* Разработанная методика инактивации генов β-лактамаз *F. tularensis* гомологичной рекомбинацией с помощью плазмиды pGM6 позволила нам получить ряд мутантных вариантов штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ с инактивированными генами β-лактамаз. Изучение лактамазной активности и антибиотикорезистентности мутантных клонов показало, что только ген *bla2* кодирует функционально активную β-лактамазу, ответственную за резистентность к β-лактамам группы пенициллинов (но не цефалоспоринов и карбапенемов). Инактивация двух других β-лактамаз не приводила к изменению чувствительности туляремийного микроба к β-лактамным антибиотикам. При введении в клетки штаммов 15Δ*bla*2 и 15Δ*bla*123 плазмиды, содержащей маркер резистентности к ампициллину, устойчивость к данному антибиотику полностью восстанавливается. Учитывая, что число маркеров антибиотикоустойчивости, используемых как инструмент для генетических манипуляций с *F. tularensis,* на данный момент ограничено двумя – хлорамфениколом и канамицином, а применение других антибиотиков в качестве маркеров запрещено международными и отечественными правилами, использование штаммов с делецией гена *bla*2 в

генно-инженерных экспериментах расширяет спектр генетического инструментария, так как их чувствительность к ампициллину позволяет трансформировать их плазмидами, несущими маркер ампициллинустойчивости.

Изучение лактамазной активности и антибиотикочувствительности штамма *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 120Δ*pur* показало, что, вопреки распространенному мнению об отсутствии β-лактамазной активности у штаммов среднеазиатского подвида, эта активность ему присуща, хотя скорость гидролиза β-лактамов при этом снижена. Причиной снижения эффективности гидролиза является, видимо, замена Gly→Arg в 97 положении белка Bla2.

Сравнительная характеристика вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и рекомбинантного 15/23-1ΔrecA с использованием двух биологических моделей – мышей и морских свинок – показала, что, хотя организм животных быстрее освобождается от бактериальных клеток штамма *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA, тем не менее, вакцинация этим штаммом приводит к формированию напряженного иммунного ответа на уровне, который обеспечивается родительским штаммом. После введения экспериментальным животным мутантного варианта снижение веса, отражающее поствакцинальные морфо-функциональные изменения в организме животных, было менее выражено. В первую неделю после вакцинации нами были выявлены лейкопения и тромбоцитопения у обоих видов экспериментальных животных, причем изменения этих параметров также были менее выражены у животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA. Оценка остроты воспалительного процесса, индуцированного иммунизацией, по изменению уровня интерферона в сыворотке мышей, а также суммарный анализ всех полученных данных позволяет сделать вывод о том, что *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA обладает менее выраженной реактогенностью по сравнению с вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Следовательно, задача по получению вакцинного

штамма с меньшей степенью реактогенности успешно выполнена. Таким образом, созданный новый штамм *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA, обладающий сниженной реактогенностью, может рассматриваться в качестве перспективной кандидат-вакцины против туляремии.

При создании нового вакцинного штамма *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA была проведена его проверка в соответствии с МУ 3.3.1.2161-07.

В ходе работы нами было убедительно показано, что результаты, полученные на морских свинках, коррелируют с результатами, полученными на мышах. Проведенные исследования позволили оптимизировать критерии оценки и методы исследования новых потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis,* в частности, было рекомендовано использовать мышиную модель в иммунологических испытаниях, как более целесообразную экономически. Кроме того, в качестве альтернативы предложено проводить ряд экспериментов *in vitro* с использованием перевиваемых клеточных линий, что более рационально как с экономических, так и с биоэтических соображений. В результате нами был разработан алгоритм сравнительных исследований штаммов *F. tularensis* с различной степенью целевой аттенуации. Алгоритм предусматривает комплексное использование оптимизированных критериев оценки и методов исследования вакцинных штаммов *F. tularensis*, основанных на информативных, хорошо изученных и широко применяемых тестах.

ВЫВОДЫ

1. На основе геномного анализа возбудителей особо опасных инфекций и использования представительной панели патогенов разработана специфичная высокочувствительная генодиагностическая тест-система «MULTI-FLU», позволяющая проводить одномоментную индикацию возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии. Разработана модифицированная система лабораторного анализа на основе праймера Chi1f и праймеров iglC340F/iglC340R с зондом iglC-RT-(Cy5) для экспресс-диагностики возбудителя туляремии, позволяющая одновременно осуществлять индикацию и определять подвидовую принадлежность *F. tularensis*.

2. Подобран и охарактеризован сокращенный набор VNTR-локусов для MLVA-типирования, позволяющий в полном объеме сохранить достоверность данных о внутривидовой кластеризации штаммов *F. tularensis* в пределах выборки из 159 штаммов туляремийного микроба, представленных в коллекции ФБУН ГНЦ ПМБ. Выявлена с помощью MLVA-типирования филогенетическая группа *F. tularensis* – Nevada, состоящая из трех штаммов, MLVA-профили которых содержат признаки голарктического и неарктического подвидов. Высказано предположение о возможности существования эволюционно более древней, чем голарктический подвид, ветви *F. tularensis*, являющейся переходной формой от subsp. *tularensis* к subsp. *holarctica*. Использование сокращенного набора MLVA17 в ходе расследования вспышки туляремии в г. Ханты-Мансийске в 2013 г. позволило выявить генетическую неоднородность выделенных штаммов, установить источники заражения людей и грызунов, ускорить получение и верификацию результатов эпидрасследования.

3. Впервые установлен факт циркуляции на территории Южной Сибири (Алтайский край) РФ подвида *mediasiatica,* ранее считавшегося географически обособленным, выявляемым только в отдельных природных очагах Средней Азии. Предложена новая гипотеза эволюционной модели

появления и распространения среднеазиатского подвида на территории Азии, заключающаяся в предположении, что он произошел от проникшего из Америки в Евразию подвида *tularensis*.

4. Созданные суицидные плазмидные векторы pGM5 и pGM6 для высокоэффективного аллельного обмена в геноме туляремийного микроба позволили получить изогенный набор штаммов с целенаправленными делециями генов *bla, qseC, purMCDN, recA, recD* и *iglC*, использованный для изучения взаимоотношений паразит-хозяин на модели туляремии и разработки современных генетически детерминированных вакцин.

5. Изучение лактамазной активности вариантов штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ с инактивированными генами β-лактамаз показало, что только ген *bla2* кодирует функционально активную β-лактамазу, ответственную за резистентность к β-лактамам группы пенициллинов (но не цефалоспоринов и карбапенемов). Показано, что, вопреки распространенному мнению, среднеазиатский подвид (на примере штамма *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 120Δ*pur*) обладает β-лактамазной активностью, хотя скорость гидролиза антибиотиков существенно снижена по сравнению с *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ. Вероятно, причиной снижения эффективности гидролиза β-лактамов является замена аминокислоты Gly→Arg в 97 положении белка Bla2. Использование штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* с делецией гена *bla2* (15Δ*bla*2 и 15Δ*bla*123) в генно-инженерных экспериментах позволяет расширить спектр маркеров антибиотикоустойчивости, применяемых в рекомбинантных плазмидах.

6. Изучение свойств штаммов – производных вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ – с целенаправленными делециями (15Δ*qseC*, 15Δ*purMCDN*, 15/23-1, 15/23-2, 15Δ*recA* и 15Δ*recD*) выявило наиболее значимые гены-мишени (одна копия гена *iglC* и ген *recA*), инактивация которых приводит к снижению реактогенности и повышению стабильности при сохранении протективных свойств исходного штамма. Создан и изучен

новый генетически детерминированный штамм *F. tularensis* 15/23-1ΔrecA, обладающий стабильностью и сниженной реактогенностью, который может рассматриваться в качестве перспективной кандидатной вакцины против туляремии.

7. Разработан алгоритм, предусматривающий комплексное использование оптимизированных критериев оценки перспективных вакцинных штаммов *F. tularensis*, основанных на информативных, хорошо изученных и широко применяемых тестах. Данный алгоритм позволяет систематизировать исследования, сократить их объем и уменьшить количество используемых для этих целей животных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В практику лабораторий, проводящих исследования возбудителей особо опасных инфекций, необходимо внедрить разработанную тест-систему «MULTI-FLU» для дифференциальной диагностики чумы, туляремии и сибирской язвы, позволяющую проводить одномоментную индикацию возбудителей этих инфекционных болезней, обеспечивая высокую чувствительность и специфичность, минимизируя время исследований.

2. Расследование эпидемических вспышек туляремии целесообразно начинать с использования эффективного не трудоемкого метода ПЦР с одним праймером Chi1f, позволяющего проводить подвидовую дифференциацию. При уточнении штаммовой принадлежности возбудителя, необходимой для установления источника инфекции и путей его распространения, рекомендуется проведение MLVA типирования с использованием оптимизированного набора из 17 VNTR-локусов.

3. Для проведения сайт-направленного мутагенеза в туляремийном микробе рекомендовать использовать наиболее эффективные на данный момент суицидные плазмиды pGM5 и pGM6.

4. Изучение β-лактамазной активности у различных подвидов *F. tularensis* из-за сниженной скорости гидролиза β-лактамных антибиотиков штаммами среднеазиатского подвида следует проводить, строго соблюдая временной (не более 4 часов) и концентрационный (не более 10^6 КОЕ/мл) регламент выполнения анализа.

5.Для существенного расширения арсенала генно-инженерных инструментов, пригодных для изучения туляремийного микроба, рекомендуется использовать штаммы *F. tularensis* 15Δ*bla2* и 15Δ*bla123*, несущие плазмидный маркер устойчивости к ампициллину.

6. Изучение иммунобиологических свойств новых штаммов *F. tularensis* при создании генетически детерминированных вакцинных штаммов другой подвидовой принадлежности рекомендуется проводить согласно

разработанному комплексному оптимизированному алгоритму отбора потенциальных вакцинных штаммов *F. tularensis*.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Существует несколько направлений дальнейших исследований: необходимо продолжить изучение циркуляции подвида *mediasiatica* на территории Российской Федерации и сопредельных государств (Монголии и Китая) с конкретным определением очагов, их распространенности и штаммовой полиморфности. Это позволит расширить наши представления о среднеазиатском подвиде, подтвердить или опровергнуть предложенную нами эволюционную модель происхождения *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

Имеет особое значение расширение спектра штаммов подвида *tularensis* для продолжения исследований, связанных с фактом обнаружения филогенетической группы Nevada, что позволит получить новые знания об эволюции и микроэволюции *F. tularensis*.

Расширение спектра анализируемых штаммов, выделенных в эндемичных по туляремии районах на территории РФ и за рубежом, и применение усовершенствованных методов генотипирования позволит вывести картирование природных очагов на новый методологический уровень.

Остается открытым вопрос об оценке активности природных очагов. Необходима дальнейшая разработка методов скринингового мониторинга параметров оценки активности очага по выявлению как положительных генодиагностических проб из объектов внешней среды, от основных носителей и переносчиков, так и наличию антител к возбудителю туляремии у основных носителей *F. tularensis*.

Не теряет своей актуальности и конструирование штаммов на основе подвидов *mediasiatica* и *tularensis* с целенаправленно инактивированными генами для специфической профилактики туляремии, поскольку эффективность защиты, формируемой вакцинным штаммом голарктического

подвида, от инфицирования штаммами *F. tularensis* subsp. *tularensis* и, возможно, subsp. *mediasiatica*, снижается в отдаленные сроки после иммунизации.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АПК	- Антиген презентирующие клетки
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
Да	- Дальтон
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксинуклеозидтрифосфаты
ИНИПЧИ СДВ	- Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока
ИФА	- Иммуноферментный анализ
кДа (kDa)	- килодальтон
кДНК	- комплиментарная ДНК, полученная на матрице РНК
КОЕ	- Колониеобразующая единица
ЛПС	- Липополисахарид
М	- Моль
м.к.	- микробная клетка
МПА	- мясопептонный агар
мРНК	- Матричная рибонуклеиновая кислота
МФА	- Метод флюоресцирующих антител
Н/Д	- нет данных
НИ	- Настоящее исследование
НИИЭГ	- Научно исследовательский институт эпидемиологии и гигиены
НИПЧИСДВ	- Научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока
НКС	- Нормальная кроличья сыворотка
ОП	- Величина оптической плотности
ОФД	- о-фенилендиамина
п.о.	- пара (нуклеотидных) оснований
п/к	- Подкожное введение
ПААГ	- полиакриламидный гель
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ (RT-PCR)	- Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
РА	- Реакция агглютинации
РИФ	- Реакции иммунофлуоресценции
РНК	- Рибонуклеиновая кислота
т.п.о. (kb)	- тысяча пар нуклеотидных оснований (kilobase)
ЧК	- «чувства кворума»
УФ-	- Ультрафиолетовое облучение
ФБУН ГНЦ	- Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный

ПМБ	центр прикладной микробиологии и биотехнологии
ФНО-α	- Фактор некроза опухали
Ap	- Ампицилин
Ap^R	- Устойчивость к ампицилину
Ap^S	- Чувствительность к ампицилину
bv.	- биовар
Cm	- Хлорамфеникол
Cm^R	- Устойчивость к хлорамфениколу
Cm^S	- Чувствительность к хлорамфениколу
Ct	- Порог флюоресценции
DCL(LD100)	- Безусловная летальная доза
DFR	- (different region) - отличающийся участок ДНК – видо-, группо- или штаммоспецифичные фрагменты ДНК
DMEM	- Среда Игла в модификации Дульбекко
DR	- (Direct Repeated sequences) - последовательности прямых повторов
ED50	- Доза иммунизации защищающая 50 % популяции животных зараженных DCL
FT	- среда для культивирования туляремийного микроба
iglC	- Ген, отвечающий за размножение клеток *F. tularensis* в макрофагах
IL-10	- Интерлейкин 10
IL-12	- Интерлейкин 12
IL-17	- Интерлейкин 17
IL-1β	- Интерлейкин 1β
IL-2	- Интерлейкин 2
IL-23	- Интерлейкин 23
IL-4	- Интерлейкин 4
IL-6	- Интерлейкин 6
in vitro	- эксперимент “в пробирке”, без использования животных
in vivo	- эксперимент на животных
IS-элемент	- (Insertion Sequence) – инсерционная последовательность – короткий фрагмент ДНК, простой мобильный генетический элемент
LB	- Среда Luria-Bertani
LD_{50}	- Летальная доза для 50 % популяции животных
LVS	- Штамм *F. tularensis*
MCP-1	- monocyte chemotactic protein 1 (моноцитарный хемотаксический белок)
MHC 1	- major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)
MIP-2	- macrophage inflammatory protein 2 (макрофагальный воспалительный белок)
MLST	- (Multilocus Sequence Typing) – мультилокусное секвенирование
MLVA	- (Multiple-Locus VNTR Analysis) – мультилокусный VNTR-анализ
NF-kB	- Универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла
PFGE	- (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) – гель-электрофорез в пульсирующем поле

Pm	- Полимиксин
Pm	- Полимиксин
Pm^R	- Устойчивость к полимиксину
PmR	- Устойчивость к полимиксину
purMCDN	- Гены, кодирующие ферменты, участвующие в синтезе пуринов
qseC	- Ген, относящийся к системе «чувства кворума»
recA	- Ген, кодирующий белок RecA
recD	- Ген, кодирующий α-цепь экзонуклеазы V
RFLP	- (Restriction Fragment Length Polymorphism) – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
sacB	- Ген, кодирующий фермент, участвующий в полимеризации сахарозы
SNP	- (Single Nucleotide Polymorphism) –полиморфизм единичных нуклеотидов
SodB	- Супероксиддисмутаза
subs	- (subspecies) подвид
Suc	- Сахароза
Suc^R	- Устойчивость к сахарозе
Suc^S	- Чувствительность к сахарозе
TAE	- Трис-ацетат-ЭДТА буфер
UPGMA	- (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) – метод попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением
VNTR	- (Variable-Number Tandem Repeat) – вариабельные тандемные повторы – участки ДНК с переменным количеством прямых повторов

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л.: Медгиз., 1962. – С. 85–104.

2 Балахонов, С.В. Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговыминфекционным болезням бактериальной и вирусной этиологии в 2012 г. в Сибири и на Дальнем Востоке и прогноз ее развития на 2013 г. / С.В. Балахонов, С.А. Косилко, Н.В. Бренёва А.В. Мазепа, Л.П. Окунев, В.Т. Климов, А.Я. Никитин, Е.А. Сидорова, А.В. Севостьянова, Ю.Н. Трушина, О.В. Мельникова, М.Б. Ярыгина, С.Э. Худченко, М.В. Чеснокова, Е.И. Андаев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 1. – С. 38-43

3 Безсмертный, В.Е. Обзор эпизоотической ситуации по туляремии на территории Российской Федерации во втором полугодии 2008 г. И прогноз на первое полугодие 2009г. / В.Е. Безсмертный, В.П. Попов, В.И. Жуков, С.М. Иванова // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2009. – № 100. – С. 11-13.

4 Боринская, С.А. Структура прокариотических геномов / С.А. Боринская, Н.А. Янковский // Биохимия. – 1999. – Т. 33. – № 6. – С. 941–957

5 Васильева, Г.И. Фагоцитоз туляремийного микроба макрофагами, полученными от животных с различной природной устойчивостью к туляремии / Г.И Васильева, А.К. Киселева, Л.В. Попкова // Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 1983. – № 10. – С. 108-109.

6 Вахрамеева, Г.М. ПЦР дифференциация подвидов Francisella tularensis с помощью одного праймера / Г.М. Вахрамеева, А.А. Лапин, В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич, Р.И. Миронова, И.А. Дятлов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 107. – С. 46-46

7 Водопьянов, А.С. Генотипическая гетерогенность и географическое разнообразие коллекционных штаммов *F. tularensis* по данным VNTR-анализа их ДНК / А.С. Водопьянов, Б.Н. Мишанькин, Н.В. Павлович, Н.Л. Пичурина // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2007. – № 2. – С. 33-40

8 Водопьянов, А.С. Генотипическое разнообразие *Francisella tularensis*: VNTR- анализ: автореф. дис. … канд. мед. наук: 03.00.23; 03.00.07 / Алексей Сергеевич Водопьянов. Ставрополь., – 2009. – 18 с.

9 Волох, О.А. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса возбудителя туляремии как перспективного компонента химических вакцин / О.А Волох, И.А. Шепелёв, В.В. Фирстова, Е.М. Храмкова, Н.Г. Авдеева, Ю.И. Самохвалова, *В*.Е. Жемчугов, И.А. Дятлов, С.А. Еремин / Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 2007. – № 3. – С. 16-21.

10 Воробьев, А.А. Оценка вероятности использовании биоагентов в качестве биологического оружия / А.А. Воробьев // Эпидемиол. и

инф. болезни. – 2001. – № 6 – С. 54-56

11 Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкеи – М.: Мир, 1982. – 448 с.

12 Гинцбург, А.Л. Генодиагностика инфекционных заболеваний / А.Л. Гинцбург // Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 1998. – № 3. – С.86-95

13 Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году» http://www.rospotrebnadzor.ru/gd_2013_dlya-sayta.pdf

14 Девяткин, Е.В. Кайнозой Внутренней Монголии / Е.В. Девяткин – М.: Наука, 1981. – 195 с

15 Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – С.-Петербург, 2010. –48 с.

16 Домарадский, И.В. Проблемы патогенности франсиселл и пути их решения / И.В. Домарадский // Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 2005. – № 1. – С. 106-110.

17 Дубровина, В.И. Неспецифическая резистентность морских свинок в отношении *F. tularensis* с разными фенотипическими свойствами / В.И. Дубровина, Ж.А. Коновалова, С.А. Татарников // В кн.: Матер. VIII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ; 25–26 сентября 2007; Саратов. – 2007. – С. 198–200

18 Дунаева, Т.Н. Туляремия / Т.Н. Дунаева, О.С. Емельянова, И.Н. Майский, Ю.А.Мясников, Н.Г. Олсуфьев, Г.Н. Руднев, Р.А. Савельева, В.С. Сильченко; под ред. Н.Г. Олсуфьева и Г.Н. Руднева – М.: Медгиз, 1960. – 459 с.

19 Ешелкин, И.И. О выделении возбудителя туляремии в очагах предгорно-ручьевого типа на Алтае в зимний период / И.И. Ешелкин // Актуал. пробл. профилакт. туляремии: Тез. докл. Всесоюзн. конф., (15-17 окт. 1991г. г. Симферополь). М., – 1991. – С. 58-59.;

20 Жемчугов, В.Е. Пат. РФ №2221591 МПКА61К39/40 С12N1/100 А61Р31/00. Способ получения препарата для активной иммунизации против туляремии / В.Е. Жемчугов, И.А. Дятлов, В.В. Кутырев, О.А.Волох – заявл. 27.01.2003; опубл. 20.01.2004 – 8с.

21 Зуевский, А.П. Об инфицированности грунтовых вод возбудителем туляремии / А.П. Зуевский, Н.С. Панова // Актуал. пробл. профилакт. туляремии: Тез. докл. Всесоюзн. конф. (15-17 окт. 1991 г., г. Симферополь). М., – 1991. – С. 70-71.

22 Ильина, Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Генетика.– 2004. – № 11. – С. 144-145

23 Ильина, Т.С., Системы коммуникаций у бактерий и их роль в патогенности / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2006. – № 3. – С. 22-29.

24 Кисличкин, Н.Н. Пат. РФ № 230 8969 МПКА61К35/74 С12N1/00. Живая туляремийная вакцина nik-sp. *Francisella tularensis*./ Н.Н. Кисличкин, О.И. Кисличкина – заявл. 16.06.2006; опубл. 27.10.2007 – 10с.

25 Кологоров, А.И. Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым и зоонозным инфекциям в Приволжском федеральном округе в 2000–2009 гг. и прогноз на 2010 г. / А.И. Кологоров, Л.Н. Дмитриева, А.Е. Шиянова, М.А. Тарасов, А.М. Поршаков, Н.В. Попов, В.П. Топорков, А.В. Топорков, В.В. Кутырев // Пробл. особо опасных инф. – 2010. – №2. – Вып. 104. – С. 5-10.

26 Комаров, В.Л. Введение к флорам Китая и Монголии / В.Л. Комаров. Избр. соч. – М., Л.: Изд-во АН СССР, 1947. – Т.2 – 377 с.

27 Куделина, Р.И. Дифференциация географических рас туляремийного микроба при помощи некоторых антибиотиков / Р.И. Куделина, Н.Г. Олсуфьев // Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 1973. – № 4 – С. 3-9.

28 Лапин, А.А. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis* / А.А. Лапин, В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич, Л.В. Домотенко, М.В. Храмов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2009. – Вып. 102. – С. 66–67.

29 Лапин, А.А. Изучение влияние УФ-облучения и воздействия налидиксовой кислоты на индукцию RecA-белка *Francisella tularensis* 15/10 / А.А. Лапин, Т.Б. Кравченко, А.Н. Мокриевич, Г.М. Вахрамеева, Т.И. Комбарова, И.А. Дятлов, В.М. Павлов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2011. – № 3. – Вып. 109.– С. 36-39.

30 Лившиц, Ю.И. Требования к качеству лабораторных грызунов и условия их содержания: Руководство по вакцинному и сывороточному делу / Ю.И. Лившиц. – М.: Медицина, 1978. – С. 24-36.

31 Лили, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лили. – М.: Мир, 1969. – 645 с.

32 Льюин, Б. Гены / Б. Льюин – Издательство: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012 –896 с.

33 Маненкова, Г.М. Молочная вспышка туляремии в Москве / Г.М. Маненкова, Л.В. Родина, Л.А. Цвиль, Ю. П. Солодовников // Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 1996. – №5. – С. 123-124.

34 Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с

35 Медуницын Н.В. Вакцинология. / Н.В.Медуницын – М.: «Триада- Х», 1999. – 272 с.

36 Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем: Десятый пересмотр: Том 2. Сборник инструкций. – ВОЗ, 1995. – 175 с.

37 Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем: Десятый пересмотр. – Женева: ВОЗ, 1995. – Т.1. - Ч.1. – 698 с.

38 Меркулов, Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов. – М.: Медицина, 1969. – 423 с.

39 Мещерякова, И.С. Пат.SU№ 1839960 C12T1/60 A61K39/02. Штамм бактерий *Francisella tularensis* для приготовления живой вакцины против туляремийной инфекции / И.С. Мещерякова, В.Г. Петровская, Б.И. Маракуша, М.И. Кормилицина – заявл. 19.01.1987; опубл. 20.06.2006– 6с.

40 Мещерякова, И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика (к 80-летиюсоздания первой туляремийной лаборатории в России) / И.С. Мещерякова // Журн. Эпидемиол. Вакципроф. – 2010. – № 2(51). – С. 17-22.

41 Мещерякова, И.С. Выявление природных очагов туляремии на территории Монголии / И.С. Мещерякова, Э.И. Коренберг, D. Tserennorov, Т.В. Михайлова, М.И. Кормилицына, D. Batjav, Y. Dagvadorj, Т.Н. Демидова, D. Otgonbaatar, N. Enkhbold, L. Mendamar // Журн. Микробиол. – 2011. – №5. – С. 31-36.

42 Мирончук, Ю.В. Гидробиологические факторы в экологии *Francisella tularensis* (экспериментальные материалы) / Ю.В. Мирончук, А.В. Мазепа, С.Г. Саппо //Журн. инфекц. патологии. – 1998. – № 4.– С. 58-63.

43 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.

44 Мокриевич, А.Н. Криотрансформация туляремийного микроба плазмидной ДНК / А.Н. Мокриевич, В.В. Фурсов, В.М. Павлов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 1994. – №. 4(74). – С. 186-190.

45 Мокриевич, А.Н. Биологические свойства и строение липополисахарида вакцинного штамма *Francisella tularensis*, полученного при инактивации гена системы «чувства кворума» *qseC* / А.Н. Мокриевич, А.Н. Кондакова, Э. Валаде, М.Е. Платонов, Г.М. Вахрамеева, Р.З. Шайхутдинова, Р.И. Миронова, Д. Блаха, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, Т.Б. Кравченко, Т.И. Комбарова, Д. Видаль, В.М. Павлов, Б. Линднер, И.А. Дятлов, Ю.А. Книрель // Биохимия. – 2010.– № 4(Т. 75). – С. 539-548.

46 Мокриевич, А.Н. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края /

А.Н. Мокриевич, В.С. Тимофеев, Т.Ю. Кудрявцева, Г.И. Уланова, С.Б. Карбышева, Р.И. Миронова, Г.М. Вахрамеева, Т.И. Губарева, В.М. Павлов, И.А. Дятлов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2013. – № 1. – С. 66-69.

47 Мокриевич, А.Н. Создание и изучение вариантов вакцинного штамма *Francisella tularensis* без генов *iglC*. Сообщение 1 / А.Н. Мокриевич, Г.М. Вахрамеева, Р.И. Миронова, Т.И. Комбарова, Г.М. Титарева, Т.Б. Кравченко, И.В. Бахтеева, И.А. Дятлов, В.М. Павлов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2013. – № 3. – С. 70-74.

47а Мокриевич, А.Н. Получение и иммунобиологические свойства вакцинного штамма туляремийного микроба без одной копии гена *iglC* и без гена *recA* / А.Н. Мокриевич, Г.М. Вахрамеева, Г.М. Титарева, И.В. Бахтеева, Р.И. Миронова, Т.И. Комбарова, Т.Б. Кравченко, И.А. Дятлов, В.М. Павлов // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. – 2015. – № 3 – С. 33-39

48 МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией» Бюллетень нормативных и методических документов госсанэпиднадзора. – 2005. –Вып. 4(22). – С. 105-128.

49 МУ 3.3.1.2161-07 «Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба» Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. – 2007. – Вып 2(28). – С. 111-148.

50 МУК 4.2.2495-09. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. // Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 128 с

51 Никифоров, В.В. Туляремия: от открытия до наших дней. / В.В. Никифоров, Г.Н. Кареткина // Инфекц. Бол. – 2007. – №5(1). – С. 67-76.

52 Олсуфьев, Н.Г. Природная очаговость, эпидемиология и профилактика туляремии / Н.Г. Олсуфьев, Т.Н. Дунаева. – М.: Медицина, 1970. – 269 с

53 Олсуфьев, Н.Г. Сравнительное изучение штаммов туляремнйных бактерий Старого и Нового Света и их таксономия / Н.Г.Олсуфьев, О.С. Емельянова, Т.Н. Дунаева // Ж. Гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунитета. – 1959. – № 3. – С. 138-49

54 Олсуфьев, Н.Г. Внутривидовая таксономия возбудителя туляремии *Francisella tularensis* / Н.Г. Олсуфьев, И.С. Мещерякова // Ж. Гигиены Эпидемиол. Микробиол. Иммунол. – 1982. –№ 26. – С. 291-299.

55 Олсуфьев, Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии / Н.Г. Олсуфьев – М.: Медицина, 1975. – 192 с.

56 Олсуфьев, Н.Г. Текущее состояние изучения профилактики туляремийной вакциной / Н.Г. Олсуфьев // Вест. Акад. Мед. Наук

СССР. – 1958. – № 11. – С. 63-72.

57 Олсуфьев, Н.Г. Туляремия. / Н.Г. Олсуфьев, Г.П. Руднев – М.: Медгиз, 1960. –459 с.

58 Онищенко, Г.Г. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство / под ред. ак. РАМН, проф. Г.Г. Онищенко, чл.-корр. РАМН, проф. В.В. Кутырева. – Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с

59 Онищенко, Г.Г. Организация и проведение учебного процесса по подготовке специалистов в области биобезопасности и лабораторной диагностики возбудителей некоторых опасных инфекционных болезней. / Г.Г.Онищенко, Е.Б. Ежлова, Ю.В. Демина, Н.В. Шеенков, Т.Ю. Загоскина, С.В. Балахонов, Л.Е. Токарева, Т.С. Тайкова, О.А. Носкова, Т.М. Долгова, Т.А. Иванова – Учебно-методическое пособие для врачей-бактериологов, эпидемиологов, лаборантов. Иркутск, 2012. – 376 с

60 Онищенко, Г.Г.Вода и здоровье / Г.Г. Онищенко //Экология и жизнь. – 1999. – № 3. – С. 65

61 Оноприенко, Н.Н. Роль липосахарида в токсичности бактерий рода *Francicella*. / Н.Н. Оноприенко, Н.В. Павлович // Мол. Генет. Микробиол. Вирусол. – 2003. – № 3. – С. 25-28.

62 Осина, Н.А. Идентификация подвидов туляремийного микроба методом мультиплексной полимеразной цепной реакции / Н.А. Осина и др. // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2007. – № 1. – С. 92-93

63 Остапенко, Н.А. О вспышке туляремии среди населения Ханты-Мансийска и Ханты-Мансийского района в 2013 г. / Н.А. Остапенко, М.Г. Соловьева, А.А. Казачинин, И.И. Козлова, Н.М. Файзуллина, Е.Б. Ежлова // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2015. – № 2. – С. 28-32

64 Павлов, В.М. Создание векторной плазмиды для *Francisella tiilarensis* / В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 1994. – № 74. – С 191-194

65 Павлов, В.М. Клонирование гена *Francisella tularensis,* кодирующего синтез Rec A – подобного белка, в *Escherichia coli* / В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич // Матер. Всес. конф. «Актуальные проблемы профилактики туляремии». Симферополь, - 1991. - С. 142.

66 Павлов, В.М. Характеристика штаммов туляремийного микроба, выделенных от больных людей и мелких грызунов во время эпидемии туляремии в г. Ханты-Мансийске в 2013 году / В.М. Павлов, И.И. Козлова, А.Н. Мокриевич, О.Д. Шутко, В.С. Тимофеев, Р.И. Миронова, Т.С. Кузнецова, Н.М. Файзуллина, Т.Ю. Кудрявцева, Т.И. Комбарова, И.А. Дятлов // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2014. – № 2. – Вып. 124. – С. 58-62.

67 Павлов, В.М. Изоляция и молекулярно-генетическая характеристика криптической плазмиды из *Francisella novicida*-подобного штамма F6168 / В.М. Павлов, И.В. Родионова, А.Н. Мокриевич // Мол. Генет.

Микробиол. Вирусол. – 1994. – № 3. – С. 39-40.

68 Павлов, В.М. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение / В.М. Павлов, И.А. Дятлов – Москва, 2012 –267 с.

69 Павлов, В.М. Туляремийный вакцинный штамм-потенциальный бактериальный вектор / В.М. Павлов, А.Н. Мокриевич, А.Н. Носков, Н.Н. Ураков // Вестн. Мед. Акад. Наук. – 1997. – № 3. – С. 15-17.

70 Павлович, Н.В. Получение бескапсульных вариантов *Francisella tularensis* / Н.В. Павлович, Б.Н. Мишанькин, Г.И. Данилевская, В.А. Ходова, В.В. Рыжкова, М.И. Цимбалистова // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1993. – № 2. – С. 7-11.

71 Павлович, Н.В Устойчивость *Francisella tularensis* к бактерицидному действию нормальной сыворотки, как критерий для оценки вирулентности бактерий / Н.В. Павлович, В.М. Сорокин, Н.С. Благородова // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1996. – № 1. – С. 7-10.

72 Павлович, Н.В. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis* / Н.В. Павлович, Б.Н. Мишанькин // Антибиотики и Медицинская биотехнология. – 1987. – № 32. – С. 133-137.

73 Пелипенко, В.Г. О длительном бактерионосительстве при туляремии у высокочувствительных лабораторных животных и диких грызунов и возможности перехода латентной инфекции в острый инфекционный процесс / В.Г. Пелипенко, Т.А. Щекина, Г.И. Бесилова // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1983. – № 8. – С 108-109.

74 Пименов, Е.В. Разработка подхода к получению вакцинного штамма туляремийного микроба с новыми свойствами / Е.В.Пименов, И.В. Тихонов М.К. Бакулин // Иммунология и специфическая профилактика ООИ: Материалы Рос. науч. конф. Саратов. – 1993. – С. 188.

75 Померанцев, А.П. Изучение экспрессии cat гена плазмид Sa и pC194 в клетках *Escherichia coli, Francisella tularensis* и *Bacillus subtilis* / А.П. Померанцев, И.В. Домарадский, И.П. Доронин, В.В. Фурсов // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1991. – № 9. – С. 21-24.

76 Померанцев, А.П. Перенос генов бактериофагом PRD1 в модифицированные плазмидой Sa клетки *Escherichia coli* и *Francisella tularensis* / А.П. Померанцев, И.В. Домарадский, Е.Л. Жиленков, Н.А. Шишкова // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1991. – № 9. – С. 24-27

77 Померанцев, А.П. Поведение плазмиды Sa в клетках туляремийного микроба / А.П. Померанцев, И.В. Домарадский, Е.Л. Жиленков, Н.А. Шишкова // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1991. – № 9. – С. 17-21

78 Попов, В.П. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка в

природных очагах туляремии на территории Центрального Федерального округа Российской Федерации в 1992–2011 гг. / В.П. Попов, Д.С. Орлов, В.Е. Безсмертный // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2012. – вып. 114. – С. 10-14

79 Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 №708н "Об утверждении Правил лабораторной практики" (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 №18713) 2010. – 22 с.

80 Рогутинский, С.В. Эпидемиологическое расследование вспышки туляремии в Смоленской области / С.В. Рогутинский, М.М. Храмцов, А.В. Авчинников // Журн. Микробиол. – 1997. – № 2. – С. 33-37.

81 Родионова, И.В. Дифференциация географических рас *Francisella tularensis* на основании активности цитруллинуреидазы / И.В. Родионова // Лабор. дело. – 1970. – № 1. – С. 42-43.

82 Родионова, И.В. Антигенный состав белков наружней мембраны туляремийного микроба. / И.В. Родионова, В.И. Захаренко // Мол. ген. микробиол. и вирусол. – 1990. – № 11 – С. 16–8.

83 Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных –Изд-во Национальной Академии, Вашингтон, США. – 1996. – 138 с.

84 Селезнева, А.А. Гидробиологический фактор в распространении туляремии / А.А. Селезнева // Тр., сер. биол. Томский ГУ.–1953. – Т. 125. – С. 255-260.

85 Сорокин, В.М. Устойчивость *Francisella tularensis* к бактерицидному действию нормальной сыворотки / В.М. Сорокин, Н.В. Павлович, Л.Ф. Прозорова // Мол. Генет. – 1996. – № 13. – С. 249-252.

86 СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности». – М., 2003.

87 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности» – М., 2008.

88 Спирин, А.С. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. / А.С. Спирин – Изд.: Высшая школа. – 1990. – 353 с.

89 Тимофеев, В. С. Молекулярное типирование штаммов *Francisella tularensis* методом мультилокусного анализа вариабельности числа тандемных повторов / В.С. Тимофеев, Т.Ю. Кудрявцева, А.Н. Мокриевич, В.М. Павлов, И.А. Дятлов // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. – 2014. – № 1. – С. 8-15.

90 Учитель, И.Я. Макрофаги в иммунитете. / И.Я.Учитель – М.: Медицина, – 1978. – 112 с.

91 Хесин, Р.Б.Непостоянство генома. / Р.Б. Хесин –М.: Наука, – 1985. – 472 с.

92 Хирина, Н.П., Поствакцинальные изменения в системе оксида азота при иммунизации вакциной туляремийной живой сухой. / Н.П. Хирина, И.А. Васильева, А.В. Степанов // Бюлл. Эксперимент.

Биол. Мед. – 2011. – № 1 – Т. 151. – С. 63-66.

93 Хлебников, В.С. Протективные свойства внешней мембраны в экспериментальной инфекции морских свинок / В.С. Хлебников, И.Р. Головлев, А.М. Чугунов // Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 1994. – № 1. – С. 84-88.

94 Хлебников, В.С. Биохимические, антигенные и протективные свойства внешней мембараны возбудителя туляремии. / В.С. Хлебников, И.Р. Головлев, Д.П. Кулеватский, С.Ф.Аверин, С.Ю.Пширков, Н.В. Тохтамышева // Мол. Генет. Микробиол. Вирусол. – 1991. – № 7. – С. 15-20.

95 Цимбалистова, М.В. Особенности формирования устойчивости *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* к бета-лактамным антибиотикам / М.В.Цимбалистова, Н.В.Павлович // Журн. микробиол. – 2014. – № 1 – С. 3-8

96 Шеенков, Н.В. Факторы персистенции *Francisella tularensis* / Н.В. Шеенков, Э.Ф. Опочинский, А.В. Валышев, И.В.Валышева, О.Л. Карташова, А.В. Паршина // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2006. – № 1 – С. 63-6

97 Шиманюк, Н.Я. Супероксиддисмутазная активность у представителей рода *Francisella*/ Н.Я. Шиманюк, Н.В. Павлович, Б.Н. Мишанькин // Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. – 1992. – № 5-6. – С. 7-9

98 Шишкова, Н.А. Использование chi-последовательности для дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы от близкородственных бацилл / Н.А. Шишкова, А.Н. Мокриевич, В.М. Павлов, Л.И. Маринин, Г.М. Вахрамеева, Т.Ю. Кудрявцева, И.А. Дятлов // Пробл. особо опасн. инф. – 2014. – № 2. – С. 97-100.

99 Abd, H. Survival and Growth of *Francisella tularensis* in Acanthamoeba castellanii / H. Abd, T. Johansson, I. Golovliov, G. Sandstrom, M. Forsman // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69. – P. 600-606.

100 Abraham, E.P. Selective reminiscences of β-lactam antibiotics: early research on penicillin and cephalosporins / Abraham E.P. // Bioessays. – 1990. – V. 12 – P. 601-606

101 Abraham, E.P. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. / E.P. Abraham, E. Chain // Nature – 1940 – V. 373 – P. 837.

102 Adamovicz, J.J. BIODEFENSE: Research Methodology and Animal Models Reviewed by J.R. Swearengen editor CRC, 331 p./ J.J. Adamovicz, E.P. Wargo, D.M. Waag // Chapter 9. Tularemia – 2006 – P. 137-162.

103 Alkhuder, K. Glutathione provides a source of cysteine essential for intracellular multiplication of *Francisella tularensis* / K. Alkhuder, K.L. Meibom, I. Dubail, M. Dupuis, A. Charbit // PLoS Pathog. – 2009– 5:e1000284. 10.1371/journal.ppat.1000284

104 Ambler, R.P. The structure of b-lactamases. / R.P. Ambler // Philos Trans R Soc Lond (Biol.). – 1980. – V. 289 – P. 321-31.

105 Ancuta, P. Inability of the *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to

mimic or to antagonize the induction of the cell activation by endotoxins / P. Ancuta, T. Pedron, R. Girard // Infect. Immun. – 1996. – V. 64 – P. 2041-2046.

106 Anda, P. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing / P. Anda, J. Segura del Pozo, J.M. Díaz García, R. Escudero, F.J. García Peña, M.C. López Velasco, R.E. Sellek, M.R. Jiménez Chillarón, L.P. Sánchez Serrano, J.F. Martínez Navarro // Emerg Infect Dis. – 2001. – V. 7. – P. 575–82. 10.3201/eid0707.017740

107 Andersson, H. Transcriptional profiling of host responses in mouse lungs following aerosol infection with type A *Francisella tularensis* / H. Andersson, B. Hartmanova, R. Kuolee // J. Med. Microbiol. – 2006. – V. 55. – P. 263-271.

108 Anthony, L.D. Growth of *Francisella* spp. in rodent macrophages / L.D. Anthony, R.D. Burke, and F.E. Nano // Infect. Immun. – 1991. – V. 59. – P. 3291-3296.

109 Antunes, N.T. The Class A β-Lactamase FTU-1 Is Native to *Francisella tularensis* / N.T. Antunes, H. Frase, M. Toth, S.B. Vakulenko // Antimicrob. Agents Chemother. – 2012. – V. 56(2). – P. 666-671.

110 Ash, C. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of Bacillus anthracis and emetic Bacillus cereus determined by PCR-direct sequencing / C. Ash, M.D. Collins. // FEMS Microbiol. Lett. – 1992. – V. 73 – P. 75-80.

111 Ash, C. Comparative analysis of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA / C. Ash, J.A. Farrow, M. Dorsch //Int. J. Syst. Bacteriol. – 1991. – V. 41 – P. 343-347.

112 Bakshi, C.S. An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain / C.S. Bakshi, M. Malik, M.Mahawar // Vaccine. – 2008. – V. 26. – P. 5276–5288.

113 Barker, J.R. Molecular and genetic basis of pathogenesis in *Francisella tularensis* / J.R. Barker, K.E. Klose //Ann. N Y Acad. Sci. – 2007. – V. 1105. – P. 138-159.

114 Barns, S.M. Detection of Diverse New Francisella-Like Bacteria in Environmental Samples / S.M. Barns, C.C. Grow, R.T. Okinaka, P. Keim, C.R. Kuske // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71(9) – P. 5494-5500.

115 Baron, S.D. Inactivated *Francisella tularensis* live vaccine strain protects against respiratory tularemia by intranasal vaccination in an immunoglobulin A-dependent fashion / S.D. Baron, R. Singh, D.W. Metzger // Infect. Immun. – 2007. – V. 75. – P. 2152-2162.

116 Baskerville, A. Pathogenesis and pathology of respiratory tularaemia in the rabbit / A. Baskerville, P. Hambleton // Br. J. Exp. Pathol. – 1976. – V. 57. – P. 339.

117 Bell, J.F. Quantum differences in oral susceptibility of voles, *Microtus*

pennsylvaniciis, to virulent *Francisella tularensis* type B, in drinking water: implications to epidemiology / J.F. Bell, S. Stewart // J. Ecol. Dis. – 1983. – V. 2(2). – P. 151-155.

118 Bell, J.F. Virulence of *Bacterium tularense*. I. A study of the virulence of *Bacterium tularense* in mice, guinea pigs, and rabbits / J.F. Bell, C.R. Owen, C.L. Larson. // J. Infect. Dis. –1955. – V. 97. – P. 162-166.

119 Berdal, B.P. Field investigations of tularemia in Norway / B.P. Berdal, R. Mehl,'N.K. Meidell, A-M. Lorentzen-Styr // FEMS Immunol. Med. Microbiol. –1996.– V. 13. – P. 191–195

120 Berg, J.M. Molecular Cloning of the recA Gene and Construction of a recA Strain of *Francisella novicida* / J.M. Berg, K.E. Mdluli, F. Nano //Infect. and immun. – 1992. – V. 60(2). – P. 690-693.

121 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 // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 1994. – V. 1(2) – P. 238-240.

122 Bhatnagar, N. Reduced virulence of rifampicin-resistant mutants of *Francisella tularensis*. / N. Bhatnagar, E. Getachew, S. Straley // J. Infect. Dis. – 1994. – V. 170. – P. 841-847.

123 Bina, X. R. Construction of a biolumines cence reporter plasmid for *Francisella tularensis*./ X.R. Bina, M.A. Miller, J.E. Bina // Plasmid. – 2010. – V. 64. – P. 156–161

124 Bina, X.R. The Bla2 β-lactamase from the live-vaccine strain of *Francisella tularensis* encodes a functional protein that is only active against penicillin-class β-lactam antibiotics / X.R. Bina, C. Wang, M.A. Miller, J.E. Bina. // Arch. Microbiol. – 2006. – V. 186(3). – P. 219-28.

125 Brevik, O. J. Multiple-locus, variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of the fish-pathogen *Francisella noatunensis* / Ø.J. Brevik, K.F. Ottem, A. Nylund // BMC Vet Res. – 2011. – V. 7: 5 DOI**:** 10.1186/1746-6148-7-5

126 Broekhuijsen, M. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis* / M. Broekhuijsen, P. Larsson, A. Johansson M. Byström, U. Eriksson, E. Larsson, R.G. Prior, A. Sjöstedt, R.W. Titball, M. Forsman.// J Clin Microbiol. – 2003. – V. 41(7). – P. 2924-31

127 Broman, T. Molecular Detection of Persistent Francisella tularensis Subspecies holarctica in Natural Waters / T. Broman, J. Thelaus, A.-C. Andersson, S. Bäckman, P. Wikström, E. Larsson, M. Granberg, L. Karlsson, E. Bäck, H. Eliasson, R. Mattsson, A. Sjöstedt, M. Forsman // Int J Microbiol. – 2011. – ID 851946 http://dx.doi.org/10.1155/2011/851946

128 Broms, J.E. The Role of the *Francisella tularensis* pathogenicity island in

type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling / J.E. Broms, A Sjostedt, M. Lavander // Front Microbiol. – 2010. – V. 1– P. 136 doi:10.3389/fmicb.2010.00136

129 Brotcke, A. Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in *Francisella tularensis* / A. Brotcke, D.S Weiss, C.C. Kim, P. Chain, S. Malfatti, E. Garcia, D.M. Monack //Infect Immun. – 2006. – V. 74. – P. 6642–6655

130 Brown, R. *Salmonella typhi* 205aTy, a strain with two attenuating auxotrophic characters, for use in laboratory teaching / R.F. Brown, B.A.D. Stocker // Infect. Immun. – 1987. – V. 55. – P. 892-898.

131 Buchan, B.W. Identification of migR, a regulatory element of the Francisella tularensis live vaccine strain iglABCD virulence operon required for normal replication and trafficking in macrophages / B.W. Buchan, R.L. McCaffrey, S.R. Lindemann, L.A. Allen, B.D. Jones.// Infect Immun. – 2009. – V. 77(6). – P. 2517-29

132 Buchmeier, N.A. Recombination-deficient mutants of Salmonella typhimurium are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages / N.A. Buchmeier, C.J. Lipps, M.Y.H. So // Mol. Microbiol. – 1993. – V. 7. – P. 933-936.

133 Burke, D.S. Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory-acquired tularemia / D.S. Burke // J. Infect. Dis. – 1977. – V. 135. – P. 55-60.

134 Butchar, J.P. IFNgamma enhances IL-23 production during *Francisella* infection of human monocytes / J.P. Butchar, K. Parsa, V. Marsh // FEBS Lett. – 2008. – V. 582. – P. 1044-1048.

135 Bush, K. Functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure / K. Bush, G. Jacoby, A. Medeiros // Antimicrob Agents Chemother. – 1995 – V. 39. – P. 1211-33

136 Cano, D. Role of the RecBCD recombination pathway in *Salmonella* virulence / D. Cano, M. Pucciarelli, F. García-del Portillo, J. Casadesús // J Bacteriol. – 2002. – V. 184(2). – P. 592-595

137 Cebula, T.A. Chips and SNPs, bugs and thugs: a molecular sleuthing perspective / T.A. Cebula, S.A. Jackson, E.W. Brown, B. Goswami, J.E. LeClerc // J. Food Prot. – 2005. – V. 68(6). – P. 1271-1284

138 Cerny, Z. Changes of the epidemiology and the clinical picture of tularemia in Southern Moravia (the Czech Republic) during the period 1936–1999. / Z.Cerny // Eur. J. Epidemiol. – 2001. – V. 17. – P. 637-642.

139 Chamberlain, R.E. Evaluation of live tularemia vaccine prepared in a chemical defined medium / R.E. Chamberlain // Appl. Microbiol. – 1965. – V. 13. – P. 232-235.

140 Champion, M.D. Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains be-longing to low and high virulence subspecies / M.D. Champion, Q. Zeng, E.B. Nix, F.E. Nano, P. Keim, C.D. Kodira, M. Borowsky, S. Young, M. Koehrsen, R Engels, M. Pearson, C Howarth,

L Larson, J White, L. Alvarado, M. Forsman,S.W. Bearden, A. Sjöstedt,,R. Titball, S.L. Michell, B. Birren, J. Galagan // PLoSPathog. – 2009. – V. 5(5):e1000459

141 Chang, C.H. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. / C.H. Chang, Y.C. Chang, A. Underwood // Nucleic Acids Res. – 2007. – V. 35 – P. D416-D421.

142 Chanturia, G. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies holarctica from the country of Georgia / G. Chanturia, D.N. Birdsell, M. Kekelidze E. Zhgenti, G. Babuadze, N. Tsertsvadze, S. Tsanava, P. Imnadze, S.M. Beckstrom-Sternberg, J.S. Beckstrom-Sternberg, M. D. Champion, S. Sinari, M. Gyuranecz, J. Farlow, A.H. Pettus, E.L. Kaufman, J.D. Busch, T. Pearson, J.T. Foster, A.J. Vogler, D.M. Wagner , P. Kei // BMC Microbiol. – 2011. – V. 11 – P. 139.

143 Charity, J.C. Small molecule control of virulence gene expression in *Francisella tularensis* / J.C. Charity, L.T. Blalock, M.M. Costante-Hamm, D.L. Kasper, S.L. Dove // PLoS Pathog. – 2009. – V. 5(10):e1000641. doi: 10.1371/journal.ppat.1000641. pmid:19876386

144 Chen, H.-W. The RecD subunit of the RecBCD enzyme from *Escherichia coli* is a single-stranded DNA-dependent ATPase / H.-W. Chen, B. Ruan, M. Yu, D.A. Julin // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – P. 10072-10079.

145 Chen, Y. Crystal structures of penicillin-binding protein 6 from *Escherichia coli* / Y. Chen, W. Zhang, Q. Shi, D. Hesek, M. Lee, S. Mobashery, B.K. Shoichet // J Am Chem Soc. - 2009. – V. 131. – P. 14345-14354.

146 Chen, W. Susceptibility of immunodeficient mice to aerosol and systemic infection with virulent strains of *Francisella tularensis* / W. Chen, R. KuoLee, H. Shen, J.W. Conlan // Microb. Pathog. – 2004. – V. 36. – P. 311-318.

147 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.

148 Chong, A. Cytosolic clearance of replication-deficient mutants reveals *Francisella tularensis* interactions with the autophagic pathway / A Chong, T.D. Wehrly, R. Child, B. Hansen, S. Hwang, H.W. Virgin, J. Celli // Autophagy. – 2012. – V. 8(9). – P. 1342-56. doi: 10.4161/auto.20808

149 Christenson, B. An outbreak of tularemia in the northern part of central Sweden / B. Christenson // Scand J Infect Dis. – 1984. – V. 16. – P. 285-90.

150 Clutterbuck, P.W. The formation from glucose by members of the Penicillium chrysogenum series of a pigment, an alkali-soluble protein and penicillin - the antibacterial substance of Fleming / P.W. Clutterbuck,

R. Lovell, R. Raistrick // Biochem. J. – 1932. – V. 26. – P. 1907-1918

151 Coker, P.R. Bacillus anthracis virulence in guinea pigs vaccinated with anthrax vaccine adsorbed is linked to plasmid quantities and clonality / P.R. Coker, K.L. Smith, P.F. Fellowstt, G. Rybachuck, K.G. Kousoulas, M.E. Hugh-Jones // J. Clin. Microbiol. – 2003. – V. 41. – P. 1212-1218.

152 Collazo, C.M. Myeloid differentiation factor-88 (MyD88) is essential for control of primary in vivo *Francisella tularensis* LVS infection, but not for control of intra-macrophage bacterial replication / C.M. Collazo, A. Sher, A.I. Meierovics, K.L. Elkins // Microbes Infect. – 2006. – V. 8. – P. 779-790.

153 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.

154 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 // Infect. Immun. – 1992. – V. 60(12). – P. 5164-5171.

155 Conlan, J.W. Experimental tularemia in mice challenged by aerosol or intradermally with virulent strains of *Francisella tularensis*: bacteriologic and histopathologic studies / J.W. Conlan, W.X. Chen, H. Shen, A. Webb, R. KuoLee // Microb. Pathogenesis. – 2003. – V. 34. – P. 239-248.

156 Conlan, J.W. *Francisella tularensis*: a red-blooded pathogen / J.W. Conlan // J. Infect. Dis. – 2011. – V. 204. – No. 1. – P. 6-8.

157 Conlan, J.W. Mice intradermally-inoculated with the intact lipopolysaccharide, but not the lipid A or O-chain, from *Francisella tularensis* LVS rapidly acquire varying degrees of enhanced resistance against systemic or aerogenic challenge with virulent strains of the pathogen / J.W. Conlan, E. Vinogradov, M.A. Monteiro, M.B. Perry // Microb. Pathog. – 2003. – V. 34(1).– P. 39-45.

158 Conlan, J.W. Vaccines against *Francisella tularensis* / J.W. Conlan, P.C. Oyston // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2007. – V. 1105. – P. 325-350.

159 Conlan, W.J. 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 / W.J Conlan, H. Shen, R. Kuolee // Vaccine. – 2005. – V. 23. – P. 2477-2485.

160 Conlan, J.W. Differential ability of novel attenuated targeted deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies tularensis strain SCHU S4 to protect mice against aerosol challenge with virulent bacteria: effects of host background and route of immunization / J.W. Conlan, H. Shen, I. Golovliov // Vaccine. – 2009. – V. 28. – P. 1824-1831.

161 Conlan, J.W. Mice vaccinated with the O861 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.

162 Conlan, J.W. Molecular immunology of experimental primary tularemia in mice infected by respiratory or intradermal routes with type A *Francisella tularensis* / J.W. Conlan, X. Zhao // Mol. Immunol. – 2008. – V. 45. – P. 2962–2969.

163 Coriell, L.L. Studies on tularemia IV. Observations on tularemia in control and vaccinated monkeys. / L.L. Coriell, E.O. King, M.G. Smith // J. Immunol. – 1948. – V. 58. – P. 183-202.

164 Cowley, S.C. Lung CD4-CD8-doublenegative T cells are prominent producers of IL-17A and IFN-gamma during primary respiratory murine infection with *Francisella tularensis* live vaccine strain / S.C. Cowley, A.I. Meierovics, J.A. Frelinger // J. Immunol. – 2010. – V. 18. – P. 5791-5801.

165 Cowley, S.C. CD4-CD8-T cells control intracellular bacterial infections both *in vitro* and *in vivo* / S.C. Cowley, E. Hamilton, J.A. Frelinger // J. Exp. Med. – 2005. – V. 202. – P. 309–319.

166 Cowley, S.C. Differential requirements by CD4+ and CD8+ T cells for soluble and membrane TNF in control of *Francisella tularensis* live vaccine strain intramacrophage growth / S.C. Cowley, J.D. Sedgwick, K.L. Elkins // J. Immunol. – 2007. – V. 179. – P. 7709-7719.

167 Cowley, S.C. Immunity to *Francisella* / S.C. Cowley, K.L. Elkins. // Front Microbiol. – 2011. – V. 2. – P. 1-21.

168 Cowley, S.C. Suppression of *Francisella tularensis* growth in the rat by coinfection with *F. novicida* / S.C. Cowley, S.V. Myltseva, F.E. Nano // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – V. 153. – P. 71-74.

169 Crawford, R. Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* infection in mice / R. M.Crawford, L. Van De Verg, L. Yuan, T.L. Hadfield, R.L. Warren, E.S. Drazek, H.H. Houng, C. Hammack, K. Sasala, T. Polsinelli, J. Thompson, D.L. Hoover // Infect. Immun. – 1996. – V. 64. – P. 2188-2192

170 Crowfoot, D. X-ray crystallographic investigation of the structure of penicillin / D. Crowfoot, C.W. Bunn, B.W. Rogers-Low //. In H.T. Clarke, J.R. Johnson, R. Robinson, (ed). Chemistry of Penicillin. Princeton University Press. – 1949. – P. 310-367.

171 Dahlstrand, S. Airborne tularemia in Sweden / S. Dahlstrand, O. Ringertz, B. Zetterberg // Scand J Infect Dis. – 1971. – V. 3. – P. 7-16

172 de Kievit, T.R. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships / T.R. de Kievit, B.H. Iglewski // Infect Immun. – 2000. – V. 68(9). – P. 4839-49.

173 De Pascalis, R. Development of functional and molecular correlates of

vaccine-induced protection for a model intracellular pathogen, *F. tularensis* LVS / A.R. De Pascalis, Y. Chou, C.M. Bosio // PLoS Pathog. – 2012. – V. 8. – e1002494.

174 De Pascalis, R. Diverse myeloid and lymphoid cell subpopulations produce gamma interferon during early innate immune responses to *Francisella tularensis* live vaccine strain / R. De Pascalis, B.C. Taylor, K.L. Elkins // Infect. Immun. – 2008. – V. 76. – P. 4311-321.

175 Dennis, D.T. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management / D.T. Dennis, T.V. Inglesby, D.A. Henderson // JAMA. – 2001. – V. 285. – P. 2763-2773.

176 Desvars, A. Epidemiology and ecology of tularemia in Sweden, 1984-2012 / A. Desvars, M. Furberg, M. Hjertqvist, L. Vidman, A. Sjöstedt, P. Rydén, A. Johansson // Emerg Infect Dis. – 2015. – V. 21(1). – P. 32-9. doi: 10.3201/eid2101.140916

177 Dienst, F.T. Tularemia: a perusal of three hundred thirty-nine cases / F.T. Dienst // J. La. State Med. Soc. – 1963. – V. 115. – P. 114-127

178 Donabedian H.Quorum sensing and its relevance to infectious diseases / H. Donabedian // J Infect. – 2003. – V. 46(4). – P. 207-14

179 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. // Am. J. Med. Sci. – 1994. – V. 308. – P. 83-87.

180 Dreisbach, V.C. Purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) induces protective immunity against LVS infection that requires B cells and gamma interferon / V.C. Dreisbach, S. Cowley, K.L. Elkins, // Infect. Immun. – 2000. – V. 68. – P. 1988-1996.

181 Duckett, N.S. Intranasal interleukin-12 treatment for protection against respiratory infection with the *Francisella tularensis* live vaccine strain / N.S. Duckett, S. Olmos, D.M. Durrant // Infect. Immun. – 2005. – V. 73. – P. 2306-2311.

182 Dunn, A.K. Toward an understanding of microbial communities through analysis of communication networks / A.K. Dunn, J. Handelsman // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2002. – V. 81(1-4). – P. 565-74.

183 Duodu, S. An improved multiple-locus variable-number of tandem repeat analysis (MLVA) for the fish pathogen *Francisella noatunensis* using capillary electrophoresis / S. Duodu, X. Wan, N.M. Tandstad, P. Larsson, K. Myrtennäs, A. Sjödin, M. Forsman, D.J. Colquhoun // BMC Vet Res. – 2013. – V. 9. – P. 252

184 Dworzanski, J.P. Classification and identification of bacteria using mass spectrometry-based proteomics / J.P. Dworzanski, A.P. Snyder // Expert Rev. Proteomics. – 2005. – V. 2. – P. 863-878.

185 Dworzanski, J.P. Mass pectrometry based proteomics combined with bioinformatic tools for bacterial classification / J.P. Dworzanski, S.V. Deshpande, R. Chen R.E. Jabbour, A.P. Snyder, C.H. Wick, L. Li //J.

Proteome Res. – 2006. – V. 5. – P. 76—87
186 Ehrlich, S.D. DNA cloning in *Bacillus subtilis* / S.D. Ehrlich // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1978. – V. 75 – P. 1433-1436
187 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 // J. Immunol. – 1961. – V. 87. – P. 415-425.
188 El Sahly, H.M. Safety, reactogenicity and immunogenicity of *Francisella tularensis* live vaccine strain in humans / H.M. El Sahly, R.L. Atmar, S.M. Patel // Vaccine. – 2009. – V. 27(36). – P. 4905-4911.
189 El-Etr, S.H. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection / S.H. El-Etr, J.J. Margolis, D. Monack R.A. Robison, M. Cohen, E. Moore, A. Rasley // Appl Environ Microbiol. – 2009. – V. 75. – P. 7488-7500. doi: 10.1128/AEM.01829-09
190 Eliasson, H. Tularaemia in an emergent area in Sweden: an analysis of 234 cases in five years / H. Eliasson, E. Bäck // Scand J Infect Dis. – 2007. – V. 39. – P. 880-9. 10.1080/00365540701402970
191 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 M. Arneborn, J. Giesecke, A. Tegnel // Emerg Infect Dis. – 2002. – V. 8. – P. 956-60. 10.3201/eid0809.020051
192 Elkins, K.L. Innate and adaptive immune responses to an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* live vaccine strain / K.L. Elkins, S.C. Cowley, C.M. Bosio // Microbes Infect. – 2003. – V. 5. – P. 132-142.
193 Elkins, K.L. Innate and adaptive immunity to *Francisella* / K.L. Elkins, S.C. Cowley, C.M. Bosio // Ann. N Y Acad. Sci. – 2007. – V. 1105. – P. 284-324.
194 Ellis, J. Tularemia / J. Ellis, P.C Oyston., M. Green, R.W. Titball // Clinical. Microbiol. Rev. – 2002. – V. 15(4). – P. 631-646.
195 Eneslatt, K. Persistence of cell-mediated immunity three decades after vaccination with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* / K. Eneslatt, P. Rietz, S. Ryden // Eur. J. Immunol. – 2011. – V. 41. – P. 974-980.
196 Eneslatt, K. Signatures of T cells as correlates of immunity to *Francisella tularensis* / K Eneslatt, M. Normark, R. Bjork // PLoS One. – 2012. – V. 741. – e32367.39.
197 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 // Scand. J. Infect. Dis. – 2001. – V. 33(2). – P. 145-152.
198 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, A. Tarnvik

// J. Infect. Dis. – 1994. – V. 70. – P. 110-114.

199 Esaki, H. Rapid detection of quinolone-resistant *Salmonella* by real time SNP genotyping/ H. Esaki, K. Noda, N. Otsuki, A. Kojima, T. Asai, Y. Tamura, T. Takahashi // J. Microbiol. Methods. – 2004. – V. 58. – P. 131-134

200 Eyles, J.E. Immunodominant *Francisella tularensis* antigens identified using proteome microarray / J.E. Eyles, B. Unal, M.G. Hartley // Proteomics. – 2007. – V. 7. – P. 2172-2183.

201 Eyles, J.E. Protection afforded against aerosol challenge by systemic immunisation with inactivated *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) / J.E. Eyles, M.G Hartley, T.R. Laws, P.C. Oyston, K.F. Griffin, R.W. Titball // Microb. Pathog. – 2008. – V. 44. – P. 164-168.

202 Farlow, J. *Francisella tularensis* in the United States / J. Farlow, D.M. Wagner, M. Dukerich M. Stanley,M. Chu, K. Kubota, J. Petersen, P. Keim // Emerg Infect Dis. – 2005. – V. 11. – P. 1835-41

203 Faron, M The *Francisella tularensis* migR, trmE, and cphA genes contribute to *F. tularensis* pathogenicity island gene regulation and intracellular growth by modulation of the stress alarmone ppGpp / M. Faron, J.R. Fletcher, J.A. Rasmussen, M.E. Long, L-A.H. Allen, B.D. Jones // Infect Immun. – 2013. – V. 81(8). – P. 2800-11. doi: 10.1128/IAI.00073-13

204 Federle, M.J. Interspecies communication in bacteria / M.J. Federle, B.L. Bassler // J Clin Invest. – 2003. – V. 112(9). – P. 1291-9.

205 Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza* / A. Fleming //J Exp Pathol. – 1929. – V. 10. – P. 226–236

206 Foley, J.E. Tularemia / J.E. Foley, N.C. Nieto. // Vet. Microbiol. – 2010. – V. 140. – No. 3-4. – P. 332-338.

207 Forestal, C.A. *Francisella tularensis* has a significant extracellular phase in infected mice / C.A. Forestal, M. Malik, S. Catlett // J. Infect. Dis. – 2007. – V. 196. – P. 134-137.

208 Forestal, C.A. *Francisella tularensis* selectively induces proinflammatory changes in endothelial cells / C.A. Forestal, J.L. Benach, C. Carbonara // J. Immunol. – 2003. – V. 171. – P. 2563-2570.

209 Forsberg, A. Relevance of Type II secretion and/or Type IV pili in *Francisella* pathogenesis / A. Forsberg // Presented at the 5th International Conference on Tularemia, November 1–4. Woods Hole, MA. – 2006.

210 Forslund, A.L. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis* / A.L. Forslund, K. Kuoppa, K. Svensson // Mol. Microbiol. – 2006. – V. 59. – P. 1818-1830.

211 Fortier, A.H. Life and death of an intracellular pathogen: *Francisella tularensis* and the macrophage. Review / A.H. Fortier, S.J. Green, T. Polsinelli // Immunol. Ser. – 1994. – V. 60. – P. 349-361.

212 Foshay, L. Vaccine prophylaxis against tularemia in man / L. Foshay, W.H. Hesselbrock, H.J. Wittenberg, A.H. Rodenberg // Am. J. Public Health. – 1942. – V. 32. – P. 1131-1145.
213 Francis, E. Sources of infection and seasonal incidence of tularaemia in man. / E. Francis // Public Health Rep. – 1937. – V. 52. – P. 103-13
214 Francis, E. The occurrence of tularaemia in nature as a disease of man / E. Francis // Public Health Rep. – 1921. – V. 36. – P. 1731–1753
215 Francis, E. Tularemia. / E. Francis // *In* Tice's Practice of Medicine. M.D. Hagerstown, W.F. Prior Co., Inc. – 1942. – V. 2. – P. 603-678
216 Francis, E. A summary of present knowledge of Tularaemia / E. Francis // Medicine. – 1928. – V. 7. – P. 411-432.
217 Fuller, J.R. RipA, a cytoplasmic membrane protein conserved among Francisella species, is required for intracellular survival / J.R. Fuller, R.R. Craven, J.D. Hall, T.M. Kijek, S. Taft-Benz, T.H. Kawula // Infect Immun. – 2008. – V. 76(11). – P. 4934-43. doi: 10.1128/IAI.00475-08
218 Fulop, M. Activation of the complement system by *Francisella tularensis* lipopolysaccharide / M. Fulop, T, Webber, R. Manchee // New Microbiol. – 1993. – V. 16 – P. 141–147.
219 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.
220 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 // Vaccine. – 1995. – V. 13. – P. 1220-1225.
221 Fuqua, C. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing / C. Fuqua, M.R. Parsek, E.P. Greenberg // Annu Rev Genet. – 2001. – V. 35. – P. 439-68
222 Galanos, C. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides / C. Galanos, O. Lüderitz, O. Westphal // Eur J Biochem. – 1969. – V. 9(2). – P. 245-9
223 Gavrilin, M.A. Internalization and phagosome escape required for Francisella to induce human monocyte IL-1beta processing and release / M.A. Gavrilin, I.J. Bouakl, N.L. Knatz // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – V. 103. – No. 1. – P. 141-146.
224 Geha, R.S. Allergy and hypersensitivity. Nature versus nurture in allergy and hypersensitivity. / R.S. Geha // Curr. Opin. Immunol. – 2003. – V. 15. – P. 603-608.
225 Gentry, M. Safety, reactogenicity and immunogenicity of *Francisella tularensis* live vaccine strain in humans. / M. Gentry, J. Taormina, R. Pyles // Vaccine. – 2009. – V. 27. – P. 4905-4911.
226 Gesbert, G. Asparagine assimilation is critical for intracellular replication and dissemination of *Francisella* / G. Gesbert, E. Ramond, M. Rigard. //

Cell Microbiol. – 2014 – Vol. 16. – P. 434-49. doi: 10.1111/cmi.12227.

227 Gevers, D. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species / D. Gevers, G. Huys, J. Swings //FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – V. 205. – P. 31-36

228 Gil, H. Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence / H. Gil, G.J. Platz, C.A. Forestal // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – V. 103. – P. 12897-12902.

229 Goering, R.V. Epidemiological interpretation of chromosomal macro-restriction fragment patterns analyzed by pulsedfield gel electrophoresis / R.V. Goering, F.C. Tenover // J Clin Microbiol. – 1997. – V. 35. – P. 2432-2433.

230 Goering, R.V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsedfield gel electrophoresis / R.V. Goering // Infect Control Hosp Epidemiol. – 1993. – V. 14. – P. 595-600.

231 Goethert, H.K. Metapopulation structure for perpetuation of *Francisella tularensis* / H.K. Goethert, B. Saviet, S.R. Telford //BMC Microbiol. – 2009. – V. 9. – P. 147.

232 Golovliov, I. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis* / I. Golovliov, A. Sjostedt, A. Mokrievich, V. Pavlov // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – V. 222(2). – P. 273-280.

233 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 // Infect. Immun. – 2003. – V. 71. – P. 5940-5950.

234 Golovliov, I. Cytokine expression in the liver during the early phase of murine tularemia / I. Golovliov, G. Sandstrom, M. Ericsson // Infect. Immun. – 1995. – V. 63. – P. 534-538.

235 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. Sandström, A Tärnvik, A Sjöstedt // Infect Immun. – 1997. – V. 65. – P. 2183-9

236 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, A Tärnvik, A Sjöstedt // Infect Immun – 1997. – V. 65. – P. 2183-2189.

237 Gordon, M. Immunization of mice with irradiated *Pasteurella tularensis*. / M. Gordon, D.M. Donaldson, G. Wright. // J. Infect. Dis. – 1964. – V. 114. – P. 435-440.

238 Goze, A. Replication of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* / A. Goze, S.D. Ehrlich //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1980. – V. 77. – P. 7333-7337

239 Gray, C.G. The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth/ C.G. Gray, S.C. Cowley, F.E. Cheung, F.E. Nano // FEMS Microbiol Lett. – 2002. – V. 215(1). – P. 53-6

240 Gray, C.G. The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth / C.G. Gray, S.C. Cowley, K.K. Cheung, F.E. Nano // FEMS Microbiol. Lett. – 2002. – V. 215. – P. 53-56.

241 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. – No. 20. – P. 2680-2686.

242 Griffin, K.F. *Francisella tularensis* vaccines / K.F. Griffin, P.C. Oyston, R.W. Titball // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2007. – V. 49. – P. 315-323.

243 Gunn, J.S. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide / J.S. Gunn, R.K. Ernst // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2007. – V. 1105. – P. 202-218.

244 Gurycova, D. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe / D. Gurycova // Eur. J. Epidemiol. – 1998. – V. 14. – P. 797-802

245 Hager, A.J. Type IV pilimediated secretion modulates *Francisella* virulence. / A.J. Hager, D.L. Bolton, M.R. Pelletier // Mol. Microbiol. – 2006. – V. 62. – P. 227-237.

246 Hall, J.D. Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of *Francisella tularensis* Schu S4, LVS, or U112 / J.D. Hall, M.D. Woolard, B.M. Gunn // Infect. Immun. – 2008. – V. 76. – P. 5843-5852.

247 Hambleton, P. Changes in whole blood and serum components during *Francisella tularensis* and rabbit pox infections of rabbits / P. Hambleton // Br. J. Exp. Pathol. – 1977. – V. 58. – P. 644-652.

248 Hartley, M.G. Protection afforded by heat shock protein 60 from *Francisella tularensis* is due to copurified lipopolysaccharide / M.G. Hartley, M. Green, G. Choules D. Rogers, D.G. Rees, S. Newstead, A Sjöstedt, R.W. Titball // Infect Immun. – 2004. – V. 72. – P. 4109-4113.

249 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.

250 Hayes, E. Tularemia–United States, 1990–2000 / E Hayes, S Marshall, D Dennis //MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 2002. – V. 51. – P. 181-4.

251 Helgason, E. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: one species on the basis of genetic evidence / E. Helgason, O.A. Okstad, D.A. Caugant, H.A. Johansen, A. Fouet, M. Mock, I. Hegna, A-B. Kolst // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66. – P. 2627-2630.

252 Henry, T. Type I IFN signaling constrains IL-17A/F secretion by gammadelta T cells during bacterial infections / T. Henry,

G.S. Kirimanjeswara, T. Ruby // J. Immunol. – 2010. – V. 84. – P. 3755-3767.

253 Henson, J.B. An outbreak of tularemia in mink / J.B. Henson, J.R. Gorham, D.T. Shen // Cornell Vet. – 1978. – V. 68. – P. 78-83.

254 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. Clin. Microbiol. – 1989. – V. 27. – P. 1601-1608.

255 Horii, T. Regulation of the SOS functions-P. purification of E. coli LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein / T.Horii, T. Ogawa, T. Nakatani, T. Hase, H. Matsubara, H. Ogawa // Cell.– 1981.– V. 27.–P. 515-522.

256 Horne, H. Eine Lemmingpest und eine Meerschweinchenepizootie. Ein Beitrag zur Beleuchtung der Ursachen der Lemmingsterbe in den sogenannten Lemmingjahren / H. Horne // Zbl. Bact, orig. –1912.– V. 66(2/4).–P. 169-193.

257 Hörnfeldt, B. Cycles in voles and small game in relation to variations in plant production indices in Northern Sweden./ B. Hörnfeldt, O. Löfgren, B.G. Carlsson // Oecologia (Berl.). –1986.– V. 68.–P. 496-502

258 Hornick, R.B. Aerogenic immunization of man with live Tularemia vaccine / R.B. Hornick, H.T. Eigelsbach // Bacteriol Rev. – 1966. – V. 30. – P. 532-538.

259 Hornick, R.B. Tularemia epidemic —Vermont. / R.B. Hornick, H.T. Eigelsbach // N. Engl. J. Med. – 1968. – V. 281(23). – P. 1310-1315.

260 Huber, B. Description of *Francisella hispaniensis* sp. *nov.*, isolated from human blood, re-classifi-cation 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 E. Seibold, H.C. Scholz, P. Anda, P. Kampfer, W.D. Splettstoesser // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2010. – V. 60. – P. 1887-1896

261 Hunter, P.R. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity / P.R. Hunter, M.A. Gaston // J Clin Microbiol – 1988. – V. 26.– P. 2465-2466

262 Huntley, J.F. Native outer membrane proteins protect mice against pulmonary challenge with virulent type A *Francisella tularensis* / J.F. Huntley, P.G. Conley, D.A. Rasko // Infect. Immun. – 2008. – V. 76. – P. 3664-3671.

263 Jackson, K.A. Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / K.A. Jackson, V. Edwards-Jones, C.W. Sutton, A.J. Fox //. J Microbiol Methods. – 2005. – V. 62. – P. 273-284.

264 Jackson, M. Persistence and protective eficacy of a *Mycobacterium*

tuberculosis auxotroph vaccine / M. Jackson, S.W. Phalen, M. Lagranderie, D. Ensergueix, P. Chavarot, G. Marchal, D.N. McMurray, B. Gicquel, C. Guilhot // Infect. Immun. - 1999. - Vol. 67. - P. 2867-2873

265 Janovska, S. Identification of immunoreactive antigens in membrane proteins enriched fraction from *Francisella tularensis* LVS / S.I. Janovska, M. Pavkova, J. Hubalek J. Lenčo, A. Macela, J. Stulík // Immunol Lett. – 2007. – V. 108. – P. 151-159.

266 Janse, I. Reliable detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification / I. Janse, R.A. Hamidjaja, J.M. Bok, B.J. Rotterdam //BMC Microbiology. – 2010. – V. 10. – P. 314 doi:10.1186/1471-2180-10-314

267 Jellison, W. Tularemia in North America. 1930–1974 / W. Jellison // Missoula, MT.: University of Montana, – 1974. – 276p.

268 Jellison, W.L. Tularemia in sheep and in sheep industry workers in western United States / W.L Jellison, G.M. Kohls. // Public Health Monogr. – 1955. – V. 28. – P. 1-19

269 Jellison, W.L. Tularemia; geographical distribution of deerfly fever and the biting fly, *Chrysops discalis* Williston. / W.L. Jellison // Public Health Rep. – 1950. – V. 65. – P. 1321-1329.

270 Jia, Q.A. *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) mutant with a deletion in capB, encoding a putative capsular biosynthesis protein, is significantly more attenuated than LVS yet induces potent protective immunity in mice against *F. tularensis* challenge / Q. Jia, B.Y. Lee, R. Bowen // Infect. Immun. – 2010. – Vol. 78. – P. 4341-355.

271 Jia, Q. Recombinant attenuated Listeria monocytogenes vaccine expressing *Francisella tularensis* IglC induces protection in mice against aerosolized Type A *F. tularensis* / Q. Jia, B.Y. Lee, D.L Clemens // Vaccine. – 2009. – V. 27. – P. 1216-1229.

272 Johansson, A. Evaluation of PCR-Based Methods for Discrimination of Francisella Species and Subspecies and Development of a Specific PCR That Distinguishes the Two Major Subspecies of *Francisella tularensis* / A. Johansson, A. Ibrahim, I. Göransson, U. Eriksson, D. Gurycova, J.E. Clarridge, A. Sjöstedt // J. Clin. Microbiol. – 2000. – V. 38(11). – P. 4180-4185

273 Johansson, A. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis* / A. Johansson, M. Forsman, A. Sjostedt // APMIS. – 2008. – V. 112. – P. 898-907

274 Johansson, A. Worldwide Genetic Relationships among Francisella tularensis Isolates Determined by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis / A. Johansson, J. Farlow, P. Larsson, M. Dukerich, E. Chambers, M. Byström, J. Fox, M. Chu, M. Forsman, A. Sjöstedt, P. Keim // J. Bacteriol. – 2004. – V. 186(17) – P. 5808-5818

275 Jones, B. D. Uncovering the components of the *Francisella*

tularensis virulence stealth strategy / B.D. Jones, M. Faron, J. A. Rasmussen // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2014. – V. 4. – P. 32. 10.3389/fcimb.2014.00032

276 Jones, M.B. Detection of a luxS-signaling molecule in Bacillus anthracis / M.B. Jones, M.J. Blaser // Infect. Immun. – 2003. – V. 71(7). – P. 3914-9

277 Jusatz, H.J. Tularemia in Europe, 1926–1951 / H.J. Jusatz // *In* Welt-Suchen Atlas, E. Rodenwaldt, Ed. – 1952. –V. 1 – P. 7–16.

278 Kadull, P.J. Studies on tularemia. V. Immunisation of man / P.J. Kadull, H.R. Reames, L.L. Coriell, L. Foshay // J. Immunol. – 1950. – V. 65. – P. 425-435.

279 Karlsson, J. Sequencing of the *Francisella tularensis* strain Schu 4 genome reveals the shikimate and purine metabolic pathways, targets for the construction of a rationally attenuated auxotrophic vaccine / J. Karlsson, R.G. Prior, K. Williams, L. Lindler, K.A. Brown, N. Chatwell, K. Hjalmarsson, N. Loman, K.A. Mack, M. Pallen, M. Popek, G. Sandström, A. Sjöstedt, T. Svensson, I. Tamas, S.G.E. Andersson, B.W. Wren, P.C.F. Oyston, R.W. Titball // Microbiol. Comp. Gen. – 2000. – V. 5. – P. 25-39

280 Karttunen, R. *Francisella tularensis*-induced in vitro gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 2 responses appear within 2 weeks of tularemia vaccination in human beings / R. Karttunen, H.M. Surcel, G. Andersson // J. Clin. Microbiol. – 1991. – V. 29. – P. 753-756.

281 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 // J. Clin. Microbiol. – 1987. – V. 25(6). – P. 1074-1078.

282 Kay, W. Characterization of the lipopolysaccharide and β-glucan of the fish pathogen *Francisella* victoria / W. Kay, B.O. Petersen, J.Ø. Duus, M.B. Perry, E. Vinogradov // FEBS. – 2006. – V. 273. – P. 3002-3013.

283 Keim, P. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella* / P. Keim, A. Johansson, D.M. Wagner //Ann N YAcad Sci. – 2007. – V. 1105. – P. 30-66.

284 Keller, M. Tuberculosis vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Russia is a natural *recA* mutant / M. Keller, E.C. Boettger, P. Sande // BMC Microbiol. – 2008. – V. 8. – P. 120. doi: 10.1186/1471-2180-8-120.

285 Ketavarapu, J.M. Mast cells inhibit intramacrophage *Francisella tularensis* replication via contact and secreted products including IL-4 / J.M. Ketavarapu, A.R. Rodriguez, J.J. Yu // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2008. – V. 105. – P. 9313-9318.

286 Khatenever, L.M. The allergic diagnosis, specific prophylaxis and vaccinotherapy of tularemia / L.M. Khatenever, E.B. Balsky, I.G. Kochergin, V.V. Porin // Microbiology and epidemiology. English Edition, Medical Publications, Ltd., London, – 1943. – P. 62-79.

287 Kilmury, S.L.N. The *Francisella tularensis* proteome and its recognition by antibodies. / S.L.N. Kilmury, S.M. Twine // Front Microbiol. – 2010. – V. 1 – P. 143.

288 Kim, K. Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group bymultiplex real-time PCR melting curve analysis / K. Kim, J. Seo, K. Wheeler, C. Park, D. Kim, S. Park, W. Kim, S.I. Chung, T. Leighton // FEMS Immunology and MedicalMicrobiology. –2005. – V. 43(2). – P. 301-310.

289 Kingry, L.C. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida* / L.C. Kingry, J.M. Petersen // Front Cell Infect Microbiol. – 2014. – V. 13. – P. 35.

290 Kirimanjeswara, G.S. Prophylactic and therapeutic use of antibodies for protection against respiratory infection with *Francisella tularensis* / G.S. Kirimanjeswara, J.M. Golden, C.S. Bakshi // J. Immunol. – 2007. – V. 179. – P. 532-539.

291 Klimpel, G. Role of primary human alveolar epithelial cells in host defense against *Francisella tularensis* infection / G. Klimpel, T. Eaves-Pyles // Infect. Immun. – 2007. – V. 75. – P. 3969-3978.

292 Koskela, P. Cell-mediated and humoral immunity induced by a live *Francisella tularensis* vaccine / P. Koskela, E. Herva // Infect. Immun. – 1982. – V. 36. – No. 3. – P. 983-989.

293 Koskela, P. Cell-mediated immunity against *Francisella tularensis* after natural infection / P. Koskela, and E. Herva // Scand. J. Infect. Dis. – 1980. – V. 12. – P. 281-287.

294 Koskela, P. Humoral immunity against *Francisella tularensis* after natural infection. / P. Koskela, A. Salminen // J. Clin. Microbiol. – 1985. – V. 22. – P. 973-979.

295 Kowalczykowski, S.C. Mechanistic aspects of the DNA strand exchange activity of *E. coli* recA protein / S.C. Kowalczykowski // Trends Biochem. Sci. – 1987. – V. 12. – P. 141-145.

296 Kowalczykowski, S.C. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli* / S.C. Kowalczykowski, D.A. Dixon, A.K. Eggleston, S.D. Lauder, W.M. Rehrauer // Microbiol Rev. – 1994. – V. 58(3). – P. 401-65. Review

297 Krivinka, J. Patho-anatomical changes in animals infected with tularaemia / J. Krivinka // Spisy Vysoke skoly zverolekarske Brno. – 1939. – V. 16. – P. 131-261. (In Czech, with a summary in German)

298 Kroca, M. The proportion of circulating gamma/delta T cells increases after the first week of onset of tularaemia and remains elevated for more than a year / M. Kroca, A. Tarnvik, A. Sjostedt // Clin. Exp. Immunol. – 2000. – V. 120. – P. 280-284.

299 Kudelina, R.I. Sensitivity to macrolide antibiotics and lincomycin in *Francisella holarctica* / R.I. Kudelina, N.G. Olfsufjev // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. – 1980. – V. 24 – P. 84-91.

300 Kugeler, K.J. Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts when screening ticks by PCR / K.J. Kugeler, N. Gurfield, J.G. Creek, J.M. Hübschen, R.S. Vatcheva-Dobrevska, E.G. Dobreva, T.V. Kantardjiev, C.P. Muller // Appl Environ Microbiol. – 2005. – V. 71 – P. 7594-7597.

301 Kugeler, K.J. Isolation and characterization of a novel *Francisella* sp. from human cerebrospinal fluid and blood / K.J. Kugeler, P.S. Mead, K.L. McGowan // J. Clin. Microbiol. – 2008. – V. 46. – P. 2428-2431.

302 KuoLee, R. Oral immunization of mice with the live vaccine strain (LVS) of *Francisella tularensis* protects mice against respiratory challenge with virulent type A *F. tularensis* / R. KuoLee, G. Harris, J.W Conlan, W. Chen // Vaccine – 2007. – V. 25. – P. 3781-3791.

303 Lai, X.H. Expression of IglC is necessary for intracellular growth and induction of apoptosis in murine macrophages by *Francisella tularensis* / X.H. Lai, I. Golovliov, A. Sjostedt. // Microb. Pathog. – 2004. – V. 37. – P. 225-230.

304 Larsson, P. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis* / P. Larsson, K. Svensson, L. Karlsson D. Guala, M. Granberg, M. Forsman, A. Johansson // Emerg Infect Dis. – 2007. – V. 13 – P. 1725–1732.

305 Larsson, P. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia / P. Larsson, P.C.F. Oyston, P. Chain // Nat. Genet. – 2005. – V. 37. – P. 153-159.

306 Lauriano, C.M. Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products / C.M. Lauriano, J.R. Barker, F.E. Nano, B.P. Arulanandam, K.E. Klose // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – V. 229 – P. 195-202.

307 Lauriano, C.M. MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. C.M. Lauriano, J.R. Barker, S.S. Yoon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2004. – V. 101. – P. 4246-4249.

308 Lavine, C.L. Immunization with heat-killed *Francisella tularensis* LVS elicits protective antibody-mediated immunity / C.L. Lavine, S.R. Clinton, I. Angelova-Fischer // Eur. J. Immunol. – 2007. – V. 37. – P. 3007-3020.

309 Le Pihive, E. Description of two new plasmids isolated from *Francisella philomiragia* strains and construction of shuttle vectors for the study of *Francisella tularensis* / E. Le Pihive, D. Blaha, S. Chenavas, F. Thibault, D. Vidal, E. Valade // Plasmid. – 2009. – V. 62. – P. 147-157.

310 Lee, B.Y. Identification, recombinant expression, immunolocalization in macrophages, and T-cell responsiveness of the major extracellular proteins of *Francisella tularensis* / B.Y. Lee, M.A. Horwitz, D.L. Clemens // Infect. Immun. – 2006. – V. 74. – P. 4002-4013.

311 Leelaporn, A. *Francisella novicida* bacteremia, Thailand. *Emerging* / A. Leelaporn, S. Yongyod, S. Limsrivanichakorn // Infect. Dis. – 2008. – V. 14. – P. 1935-1937.

312 Leiby, D.A. *In vivo* modulation of the murine immune response to *Francisella tularensis* LVS by administration of anticytokine antibodies / D.A. Leiby, A.H. Fortier, R.M. Crawford // Infect. Immun. – 1992. – V. 60. – P. 84-89.

313 Lembo, A. Administration of a synthetic TLR4 agonist protects mice from pneumonic tularemia / A. Lembo, M. Pelletier, R. Iyer // J. Immunol. – 2008. – V. 180. – P. 7574-7581.

314 Leung, K. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium* / K.Y. Leung, B.B. Finlay // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1991. – V. 88. – P. 11470-11474.

315 Lin, Y. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis* / Y. Lin, S. Ritchea, A. Logar // Immunity. – 2009. – V. 31. – P. 799-810.

316 Lindemann, S.R. *Francisella tularensis* Schu S4 O-antigen and capsule biosynthesis gene mutants induce early cell death in human macrophages / S. R.Lindemann, K. Peng, M. E. Long, J.R. Hunt, M.A. Apicella, D.M. Monack, L-A.H. Allen, B.D. Jones // Infect. Immun. – 2011. – V. 79. – P. 581–594. 10.1128/IAI.00863-10

317 Lindgren, H. Distinct roles of reactive nitrogen and oxygen species to control infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis*. / H. Lindgren, S. Stenmark, W.Chen. // Infect. Immun. – 2004. – V. 72. – P. 7172-7182.

318 Lindgren, H. Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG / H. Lindgren, H. Shen, C. Zingmark // Infect. Immun. – 2007. – V. 75. – P. 1303-1309.

319 Lindgren, H. The contribution of reactive nitrogen and oxygen species to the killing of *Francisella tularensis* LVS by murine macrophages / H. Lindgren, L. Stenman, A. Tarnvik, A. Sjostedt // Microbes Infect. – 2005. – V. 7. – P. 467-475.

320 Lindgren, M. Importance of PdpC, IglC, IglI, and IglG for modulation of a host cell death pathway induced by *Francisella tularensis* / M. Lindgren, K. Eneslätt, J.E. Bröms, A. Sjöstedt / Infect Immun. – 2013. – V. 81. – P. 2076-84. doi: 10.1128/IAI.00275-13.

321 Little, J.W. Cleavage of the *Escherichia coli* lexA protein by the recA protease / J. W.Little, S. H.Edmiston, L. Z.Pacelli, // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1980. – V. 77. – P. 3225-3229.

322 Livermore, D.M. b-lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance / D.M. Livermore, J.D. Williams // In: Lorian V., editor. Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore: Williams & Wilkins – 1991. – P. 503-78.

323 LoVullo, E.D. Single-copy chromosomal integration systems for *Francisella tularensis* / E.D. LoVullo, C.R. Molins-Schneekloth, H.P. Schweizer, H.P. Schweizer, M.S.Jr. Pavelka// Microbiology. – 2009.

– V. 155. – P. 1152-1163
324 LoVullo, E.D. Genetic tools for highly pathogenic *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* / E.D. LoVullo, L.A. Sherrill, L.L. Perez, M.S.Jr. Pavelka // Microbiology. – 2006. – V. 152. – P. 3425-3435.
325 Lyon, G.J. Chemical signaling among bacteria and its inhibition / G.J. Lyon , T.W. Muir // Chem Biol. – 2003. – V. 10(11). – P. 1007-21
326 Lyons, R.C. Animal models of *Francisella tularensis* infection / R.C. Lyons, T.H. Wu // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2007. – V. 1105. – P. 238-265.
327 Maciag, P.C. The first clinical use of a live attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: a Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix / P.C. Maciag, S. Radulovic, J. Rothman // Vaccine. – 2009. – V. 27. – P. 3975-3983.
328 Mahillon, J. Insertion sequences / J. Mahillon, M. Chandler // Microbiol. Mol.Biol. Rev. – 1998. – V. 62. – P. 725-774.
329 Maiden, M.C. Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria / M.C. Maiden //Clin Infect Dis. – 1998. – V. 27 – P. 12-20.
330 Maiden, M.C. Multilocus sequence typing of bacteria / M.C. Maiden, //Annu Rev Microbiol – 2006. – V 60 – P. 561—588.
331 Maier, T.M. Construction and characterization of a highly efficient *Francisella* shuttle plasmid / T.M. Maier, A. Havig, M.F. Casey, // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – P. 7574-7581.
332 Maier, T.M. *In vivo* Himar1-based transposon mutagenesis of *Francisella tularensis* / T.M Maier, R. Pechous, M. Casey // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V. 72. – P. 1878-1885.
333 Mara-Koosham, G. Antibodies Contribute to Effective Vaccination against Respiratory Infection by Type A *Francisella tularensis* Strains / G. Mara-Koosham, J.A. Hutt, C.R. Lyons, T.H. Wu // Infect. Immun. – 2011. – V. 79. – P. 1770-1778.
334 Mares, C.A. Initial delay in the immune response to *Francisella tularensis* is followed by hypercytokinemia characteristic of severe sepsis and correlating with upregulation and release of damage associated molecular patterns / S.S. Ojeda, E.G. Morris // Infect. Immun. – 2008. – V. 76. – P. 3001-3010.
335 Markel, G. The involvement of IL-17A in the murine response to sub-lethal inhalational infection with *Francisella tularensis* / G. Markel, E. Bar-Haim, E. Zahavy // PLoS ONE. – 2010. – V. 5. – e11176.
336 Marohn, M.E. Members of the *Francisella tularensis* phagosomal transporter subfamily of major facilitator superfamily transporters are critical for pathogenesis / M.E. Marohn, A.E. Santiago, K.A. Shirey, M. Lipsky, S.N. Vogel, E.M. Barry // Infect. Immun. – 2012. – V. 80. – P. 2390–2401. 10.1128/IAI.00144-12
337 Maslow, J. Epidemiologic typing systems / J. Maslow, M.E. Mulligan //

Infect. Control Hosp. Epidemiol. – 1996. – V. 17. – P. 595-604.

338 Matero, P. Real-time multiplex PCR assay for detection of Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis / P Matero, T Pasanen, R Laukkanen, P. Tissari, E. Tarkka, M. Vaara, M. Skurnik //APMIS. – 2009. – V. 117. – P. 34-44.

339 Mayer, L. W. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance / L.W. Mayer // Clin Microbiol Rev. – 1988. – V. 1. – P. 228-243.

340 McCaffrey, R.L. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. / R.L. McCaffrey, L.A. Allen // J. Leukoc. Biol. – 2006. – V. 80. – P. 1224-1230.

341 McCrumb, F.R. Aerosol infection of man with *Pasteurella tularensis*. / F.R. McCrumb // Bact. Rev. – 1961. – V. 25. – P. 262-267.

342 Melillo, A.A. *Francisella tularensis* antioxidants harness reactive oxygen species to restrict macrophage signaling and cytokine production / A.A. Melillo, C.S. Bakshi, J.A. Melendez // J. Biol. Chem. – 2010. – V. 285. – P. 27553-27560.

343 Metzger, D.W. Mucosal immunopathogenesis of *Francisella tularensis*. / D.W. Metzger, C.S. Bakshi, G. Kirimanjeswara // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2007. – V. 1105. – P. 266-283.

344 Michelet, L. Discriminating *Francisella tularensis* and Francisella-like endosymbionts in Dermacentor reticulatus ticks: evaluation of current molecular techniques / L. Michelet, S. Bonnet, N. Madani, S. Moutailler // Vet. Microbiol. – 2013. – V. 3. – P. 163-4

345 Mikalsen, J. Virulence and pathogenicity of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* for Atlantic cod, Gadus morhua L., and laboratory mice / J. Mikalsen, A.B. Olsen, H. Rudra *et al.* // J. Fish Dis. – 2009. – V. 32(4) – P. 377-81.

346 Miller M.B. Quorum sensing in bacteria. / M.B. Miller, B.L. Bassler // Annu Rev Microbiol. – 2001. – V. 32(4) – P. 165-99.

347 Miller, J.H. Experiments in Molecular Genetics / J.H. Miller // Gold Spring Harbor Lab., Gold Spring Harbor, New York. – 1972. – 466 p.

348 Mitsuhashi, S. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. / S. Mitsuhashi, M. Inoue // In: S. Mitsuhashi, editors. Beta-lactam antibiotics. New York: Springer-Verlag – 1981. – P. 41-56.

349 Mohapatra, N.P. Identification of an orphan response regulator required for the virulence of *Francisella* spp. and transcription of pathogenicity island genes / N.P. Mohapatra, S. Soni, B.L. Bell // Infect Immun. – 2007. – V. 75(7) – P. 3305-14.

350 Mollaret, H. Report (1966-1970) of Subcommittee on *Pasteurella*, *Yersinia* and *Francisella* to the International Committee on nomenclature of bacteria / H. Mollaret, W. Knapp // Int. J. syst. Bact. – 1971. – V. 21. – P. 157.

351 Montgomery, K. Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clin-ically significant bacteria / K. Montgomery, L.Jr. Raymundo, W.L. Drew.// J. Clin. Microbiol. – 1979. – V. 92. – P. 205-207.

352 Morner, T. A serological survey of antibodies against *Francisella tularensis* in some Swedish mammals / T. Morner and K. Sandstedt // Nord. Vet. Med. – 1983. – V. 35(2). – P. 82-85.

353 Mörner, T. Infections with *Francisella tularensis* biovar palaearctica in hares (*Lepus timidus*, *Lepus europaeus*) from Sweden / T. Mörner, G. Sandstr, R. Mattsson, P.O. Nilsson // J.Wildl. Dis. – 1988. – V. 24. – P. 422-433.

354 Morner, T. Surveillance and monitoring of wildlife diseases / T. Morner D.L. Obendorf, M. Artois // Rev. Set. Tech. – 2002. – V. 21. – P. 67-76.

355 Mörner, T. The ecology of tularaemia / T. Mörner, //Rev. Sci. Tech. – 1992. – V. 11 – P. 1123–1130.

356 Nagle, S.C.Jr. Chemically defined medium for the growth of *Pasteurella tularensis* / S.C.Jr. Nagle, R.E. Anderson, N.D. Gary //J Bacteriol. – 1960. – V. 79. – P. 566-71.

357 Nano, F.E. Identification of a heat-modifiable protein of *Francisella tularensis* and molecular cloning of the encoding gene / F.E. Nano // Microb Pathog. – 1988. – V. 5. – P. 109-19.

358 Nano, F.E. The *Francisella* pathogenicity island / F.E. Nano, C. Schmerk // Ann N Y Acad Sci. – 2007 – V. 1105 – P. 122-37.

359 Nano, F.E. A *Francisella tularensis* Pathogenicity Island Required for Intramacrophage Growth / F.E. Nano, N. Zhang // J. Bacteriol. – 2004. - V. 186(19). – P. 6430-6436.

360 Nayar, G.P. Tularemia in a group of nonhuman primates / G.P. Nayar, G.J. Crawshaw, J.L. Neufeld. // J. Am. Vet. Med. Assoc. – 1979. – V. 175(9). – P. 962-963.

361 Nelson, M. Characterization of lethal inhalational infection with *Francisella tularensis* in the common marmoset (Callithrix jacchus) / M. Nelson, M.S. Lever, R.E. Dean. // J. Med. Microbiol. – 2010. – V. 59. – P. 1107-1113.

362 Nelson, M. Establishment of lethal inhalational infection with *Francisella tularensis* (tularaemia) in the common marmoset (Callithrix jacchus) / M. Nelson, M.S. Lever, V.L. Savage, F.J. Salguero, P.C. Pearce, D.J. Stevens, A.J. Simpson. // Int. J. Exp. Pathol. – 2009. – V. 90. – P. 109-118.

363 Ngo, T.T. Enzyme-mediated immunoassay. / T.T. Ngo and H.M. Lenhoff. // Plenum Press, New York and London. – 1988. – 444 p.

364 Noah, C.E. GroEL and Lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain Synergistically Activate Human Macrophages / C.E. Noah M. Malik, D.C. Bublitz. // Infect. Immun. – 2010. – V. 78(4).– P. 1797-1806.

365 Norqvist, A. Construction of a shuttle vector for use in *Francisella tularensis*. / A. Norqvist, K. Kuoppa G. Sandstrom // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 1996. – V. 13. – P.257-260

366 Nutter, J.E. Effect of vaccine, route, and schedule on antibody response of rabbits to *Pasteurella tularensis* / J.E. Nutter // Appl. Microbiol. – 1969. – V. 17. – P. 355-359.

367 Nutter, J.E. *In vitro* interactions between rabbit alveolar macrophages and *Pasteurella tularensis* / J.E. Nutter, Q.N. Myrvik // J. Bacteriol. – 1966. – V. 92. – P. 645-651.

368 O'Callaghan, C.H. Novel method for detection of β-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate / C.H. O'Callaghan, A. Morris, S.M. Kirby, A.H. Shingler // Antimicrob. Agents Chemother. – 1972. – V. 1. – P. 283-288.

369 O'Callaghan, D. Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attention, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice / D. O'Callaghan, D. Maskell, F.Y. Liew, C.S. Easmon, G. Dougan // Infect. Immun. – 1988. – V. 56. – P. 419-423.

370 Olsufiev, N.G. Tularemia / N.G. Olsufiev, Y. Pavlovsky // *In* Human Diseases with Natural Foci. – 1966. – V. 2. – P. 219-281.

371 Olsufjev, N.G. Persistence of *Francisella tularensis* McCoy et Chapin tularemia agent in the organism of highly sensitive rodents after oral infection / N.G. Olsufjev, K.N. Shlygina, E.V. Ananova // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. – 1984. – V. 28(4). – P. 441-454.

372 Olsufjev, N.G. Subspecific taxonomy of Francisella tularensis McCoy and Chapin 1912 / N.G Olsufjev and I. S. Meshcheryakova. // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1983. – V. 33. – P. 872-874

373 Oyston, P.C. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis.* / P.C. Oyston, A. Sjostedt, R.W. Titball // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – V. 2. – P. 967-978.

374 Pandya, G.A. Whole genome single nucleotide polymorphism based phylogeny of *Francisella tularensis* and its application to the development of a strain typing assay / G.A. Pandya, M.H. Holmes, J.M. Petersen S. Pradhan, S.A. Karamycheva, M.J. Wolcott, C. Molins, M. Jones, M.E. Schriefer, R.D. Fleischmann, S.N. Peterson // BMC Microbiology – 2009. – V. 9– P. 213

375 Pannucci, J. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species / J. Pannucci, R.T. Okinaka, R. Sabin, C.R. Kuske // J. Bacteriol. – 2002. – V. 184 – P. 134-141

376 Paranavitana, C. Th17 cytokines in recall responses against *Francisella tularensis* in humans / C. Paranavitana, E. Zelazowska, L. DaSilva // J. Interferon Cytokine Res. – 2010. – Vol. 30. – P. 471-476.

377 Parker, R.R. Contamination of natural waters and mud with *Pasteurella tularensis* and tularemia in beavers and muskrats in the northwestern

United States / R.R. Parker, E.A. Steinhaus, G.M. Kohls, W.L. Jellison //Bull Natl Inst Health. – 1951. – V 193. – P. 1-161.

378 Parkhill, J. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague / J Parkhill, B.W. Wren, N.R. Thomson, R.W. Titball, M.T. Holden, M.B. Prentice, M. Sebaihia, K.D. James, C. Churcher, K.L. Mungall, S. Baker, D. Basham, S.D. Bentley, K. Brooks, A.M. Cerdeño-Tárraga,T. Chillingworth, A. Cronin, R.M. Davies, P. Davis, G. Dougan, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, A.V. Karlyshev, S. Leather, S. Moule, P.C. Oyston, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, B.G. Barrell // Nature. – 2001. – V 413. – P. 523-7.

379 Pavlov, V.M. Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like 6168: The base of plasmid vectors for *Francisella tularensis* / V.M. Pavlov, A.N. Mokrievich, K. Volkovoy // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 1996. – V 13. – P. 253-256.

380 Payne, L. Endemic tularemia, Sweden, 2003 / L. Payne, M. Arneborn, A. Tegnell, J. Giesecke // Emerg Infect Dis. – 2005. – V 11. – P. 1440–2

381 Pechous, R. Construction and characterization of an attenuated purine auxotroph in a *Francisella tularensis* live vaccine strain / R. Pechous, J. Celli, R. Penoske // Infect. Immun. – 2006. – V. 74. – P. 4452-4461.

382 Pechous, R.D. A *Francisella tularensis* Schu S4 purine auxotroph is highly attenuated in mice but offers limited protection against homologous intranasal challenge / R.D. Pechous, T.R. McCarthy, N.P. Mohapatra // PLoS ONE –2008. – V. 3. – e2487.

383 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 // Clin Infect Dis. – 2001. – V. 33. – P. 573–6. 10.1086/322601

384 Petersen, J.M. Laboratory analysis of tularemia in wild-trapped, commercially traded prairie dogs, Texas, 2002 / J.M. Petersen, M.E. Schriefer, L.G. Carter, Y. Zhou, T. Sealy, D. Bawiec, B. Yockey, S. Urich, N.S. Zeidner, S. Avashia, J.L. Kool, J. Buck, C. Lindley, L. Celeda, J.A. Monteneiri, K.L. Gage, M.C. Chu // Emerg. Infect. Dis. – 2004. – V. 10. – P. 419–425.

385 Petersen, J.M. Tularemia: emergence/re-emergence / J.M. Petersen, M.E. Schriefer // Vet Res. – 2005. – V. 36(3). – P. 455 - 467.

386 Phillips, N.J. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis* / N.J. Phillips, B. Schilling, M.K. McLendon. // Infect. Immun. – 2004. – V. 72(9). – P. 5340-5348.

387 Pohanka, M. Evaluation of immunoglobulin production during tularaemia infection in BALB/c mouse model / M. Pohanka // Acta Vet. Brno.– 2007. – V. 76. – P. 579-584

388 Pollitzer, R. History and incidence of tularemia in the Soviet Union. A review. / R. Pollitzer // Book, Print in English – 1967. – 366 p.

389 Pomerantsev, A.P. Genetic organization of the *Francisella* plasmid pFNL10 / A.P. Pomerantsev, I.R. Golovliov, Y. Ohara // Plasmid. – 2001. – V. 46(3). – P. 210-22.

390 Public Health Agency of Sweden. Disease statistics: tularemia. – 2014. http://www.folkhalsomyndigheten.se

391 Puente-Redondo, V.A. Comparison of different PCR approaches for typing of Francisel-la tularensis strains / V.A. Puente-Redondo, N. Garcia del Blanco, C.B. Gutierrez-Martin, F.J. García-Peña, E.F. Rodríguez Ferri // J. Clin. Microbiol. – 2000. – V. 38. – P. 1016-1022

392 Pyles, R.B. Toll-like receptor 3 agonist protection against experimental *Francisella tularensis* respiratory tract infection. / R.B. Pyles, G.E. Jezek, T.D. Eaves-Pyles // Infect. Immun. – 2010. – V. 78. – P. 1700-1710.

393 Qin, A. *Francisella tularensis* Schu S4 Disulfide bond formation protein B, (DsbB), but not an RND-type Efflux pump, is required for virulence. / A. Qin, D.W. Scott, B.J. Mann // Infect. Immun. – 2008. – V. 76(7). – P. 3086 - 3092.

394 Qin, A. Identification of transposon insertion mutants of *Francisella tularensis tularensis* strain SCHU S4 deficient in intracellular replication in hepatic cell line HepG2. / A. Qin, B.J. Mann. // BMC Microbiol. – 2006. – V. 6. – P. 69-79.

395 Rasko, D.A. Read. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1 / D.A. Rasko, J. Ravel, O.A. Økstad, E. Helgason, R.Z. Cer, L. Jiang, K.A. Shores, D.E. Fouts, N.J. Tourasse, S.V. Angiuoli, J. Kolonay, W.C. Nelson, A.B. Kolstø, C.M. Fraser,T.D. Read // Nucleic Acids Research. – 2004. – V. 32(3). – P. 977-988.

396 Ray, H.J. Oral live vaccine strain-induced protective immunity against pulmonary *Francisella tularensis* challenge is mediated by $CD4^+$ T cells and antibodies, including immunoglobulin A. / H.J. Ray, Y. Cong, A.K. Murthy // Clin Vaccine Immunol. – 2009. – V. 16. – P. 444-452.

397 Ray, H.J. The Fischer 344 rat reflects human susceptibility to *Francisella* pulmonary challenge and provides a new platform for virulence and protection studies. / H.J. Ray, P. Chu, T.H. Wu // PLoS ONE. – 2010. – V. 5. – e9952.

398 Raymond, C.R. Differential susceptibility of Sprague-Dawley and Fischer 344 rats to infection by *Francisella tularensis* / C.R. Raymond, J.W. Conlan // Microb. Pathog. – 2009. – V. 46. – P. 231-234.

399 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, F. D'Ancona, D.T. Dennis, M.A. Kosoy, G. Mulliqi-Osmani, R. Grunow, A. Kalaveshi, L. Gashi, I. Humolli // Emerg Infect Dis. – 2002. – V. 8. – P. 69–73. 10.3201/eid0801.010131

400 Rhinehart-Jones, T.R. Transfer of immunity against lethal murine

Francisella infection by specific antibody depends on host gamma interferon and T cells. / T.R. Rhinehart-Jones, A.H. Fortier, K.L. Elkins. // Infect. Immun. – 1994. – V. 62. – P. 3129-3137.

401 Richmond, M.H. The β-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role / M.H. Richmond, R.B. Sykes // Adv Microb Physiol. – 1973. – V. 9. – P. 31-88.

402 Rohmer, L. Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains / L. Rohmer, C. Fong, S. Abmayr, M. Wasnick, T.J. Larson Freeman, M. Radey, T. Guina, K. Svensson, H.S. Hayden, M. Jacobs, L.A. Gallagher,C. Manoil, R.K. Ernst, B. Drees, D. Buckley, E. Haugen, D. Bovee, Y. Zhou, J. Chang, R. Levy, R. Lim, W. Gillett, D. Guenthener, A. Kang, S.A. Shaffer, G. Taylor, J. Chen, B. Gallis, D.A. D'Argenio, M. Forsman, M.V. Olson, D.R. Goodlett, R. Kaul, S.I. Miller, M.J. Brittnacher // Genome Biol. – 2007. – V. 8. – P. 102.

403 Chiavolini, D. Identification of immunologic and pathologic parameters of death versus survival in respiratory tularemia / D. Chiavolini, J. Alroy, C.A. King / J. Infect. Immun. – 2008. – V. 76. – P. 486-496.

404 Rohmer, L. Potential source of *Francisella tularensis* live vaccine strain attenuation determined by genome comparison / L. Rohmer, M. Brittnacher, K. Svensson // Infect Immun – 2006. – V. 74(12). – P. 6895-6906.

405 Rolinson, G.N. 6-APA and development of the β-lactam antibiotis / G.N. Rolinson // J Antimicrob Chemother. – 1979. – V. 5. – P. 7-14.

406 Ruhfel, R. E. Interspecies transduction of plasmids among *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* / R.E. Ruhfel, N.J. Robillar, C.B. Thorne // J. Bacteriol. – 1984. – V. 157 – P. 708-711.

407 Salerno-Goncalves, R. Generation of heterogeneous memory T cells by live attenuated tularemia vaccine in humans / R. Salerno-Goncalves, M.J. Hepburn, S. Bavari // Vaccine. – 2009. – V. 28. – P. 195-206.

408 Sandstrom, G. The tularemia vaccine. Biotechnol / G.J. Sandstrom // J. Chem. Tech. – 1994. – V. 59. – P. 315-320.

409 Santic, M.A. *Francisella tularensis* pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol / M. Santic, M. Molmeret // Cell Microbiol. – 2007. – V. 9(10). – P. 2391-2403.

410 Santic, M. Cell biology and molecular ecology of *Francisella tularensis*. / M. Santic, S. Al-Khodor, Y. Abu Kwaik // Cell Microbiol. – 2010. – V. 12(2). – P. 129-139.

411 Santic, M. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. / M. Santic, M. Molmeret, K.E. Klose // Cell Microbiol. – 2005. – V. 7. – P. 969-979.

412 Saslaw, S. Tularemia vaccine study. I. Intracutaneous challenge. / S. Saslaw, H.T. Eigelsbach, H.E. Wilson // Arch. Internal Med. – 1961. –

V. 107. – P. 689-701.

413 Saslaw, S. Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge. /S. Saslaw, H.T. Eigelsbach, J.A. Prior // Arch. Internal Med. – 1961. – V. 107. – P. 702-714.

414 Sawai, T. Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of b-lactamases in gram-negative bacteria resistant to ά-aminobenzylpenicillin / T. Sawai, S. Mitsuhashi, S. Yamagishi // Jpn. J. Microbiol. – 1968. – V. 12 – P. 423–434

415 Schmitt, D.M. *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain that improves stimulation of antigen-presenting cells does not enhance vaccine efficacy / D.M. Schmitt D.M. O'Dee, J. Horzempa // PLoS One. – 2012. – V. 7(2). – P. 455-467.

416 Schricker, R.L. Pathogenesis of tularemia in monkeys aerogenically exposed to *Francisella tularensis* 425 / R.L. Schricker, H.T. Eigelsbach, J.Q. Mitten // Arch. Internal Med. – 1972. – V. 107. – P. 121-133.

417 Scoles G. Phylogenetic analysis of the *Francisella-like* endosymbionts of Dermacentor ticks / G. Scoles.// J. Med. Enthomol. – 2004. – V. 41. – P. 277-286.

418 Selander, R.K. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics / R.K. Selander, D.A. Caugant, H. Ochman, J.M. Musser, M.N. Gilmour, T.S. Whittam //Appl Environ.Microbiol. – 1986. – V. 51. – P. 873-884.

419 Shen, H. Mice sublethally infected with *Francisella novicida* U112 develop only marginal protective immunity against systemic or aerosol challenge with virulent type A or B strains of *F. tularensis* / H. Shen, W. Chen, J.W. Conlan. // Microb. Pathog. – 2004. – V. 37.– P. 107-110.

420 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. Sjostedt, P. Ryden, W. Conlan // PLoS One. – 2010. – V. 5. – e13349.

421 Shen, H. Susceptibility of various mouse strains to systemically-or aerosol-initiated tularemia by virulent type A *Francisella tularensis* before and after immunization with the attenuated live vaccine strain of the pathogen / H. Shen, W. Chen, J.W. Conlan. // Vaccine. – 2004. – V. 22. – P. 2116-2121.

422 Shoemaker, D. Humoral immune response of cottontail rabbits naturally infected with *Fraticisella tularensis* in southern Illinois / D. Shoemaker, A. Woolf, R. Kirkpatrick, M. Cooper // Wildl Dis. – 1997. – V. 33(4). – P. 733-737.

423 Sjödin, A. Whole-genome sequencing reveals distinct mutational patterns in closely related laboratory and naturally propagated *Francisella tularensis* strains / A. Sjödin, K. Svensson, M. Lindgren, M. Forsman, P. Larsson // PLoS One. – 2010. – V. 5(7). –e11556. doi: 10.1371/journal.pone.0011556

424 Sjödin, A. Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish / A. Sjödin, K. Svensson, C. Öhrman, J. Ahlinder, P. Lindgren, S. Duodu, A. Johansson, D.J. Colquhoun, P. Larsson, M. Forsman //BMC Genomics. – 2012. – V. 13 – P. 268 doi: 10.1186/1471-2164-13-26

425 Sjöstedt A Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR / A. Sjöstedt, U. Eriksson, L. Berglund, A. Tärnvik // J Clin Microbiol. – 1997. – V. 35(5) – P. 1045-8

426 Sjostedt, A. Humoral and cell-mediated immunity in mice to a 17-kilodalton lipoprotein of *Francisella tularensis* expressed by *Salmonella typhimurium* / A. Sjostedt, G. Sandstrom, A. Tarnvik // Infect. Immun. – 1992. – V. 60. – P. 2855-2862.

427 Sjostedt, A. Several membrane polypeptides of the live vaccine strain *Francisella tularensis* LVS stimulate T cells from naturally infected individuals / A. Sjostedt, G. Sandstrom, A. Tarnvik // J. Clin. Microbiol. – 1990. – V. 28. – P. 43-48.

428 Sjostedt, A. The requirement of tumour necrosis factor-alpha and interferongamma for the expression of protective immunity to secondary murine tularaemia depends on the size of the challenge inoculum / A. Sjostedt, R.J. North, J.W. Conlan // Microbiology. – 1996. – V. 142. – P. 1369-374.

429 Sjöstedt, A. The T-cell-stimulating 17-kilodalton protein of *Francisella tularensis* LVS is a lipoprotein / A. Sjöstedt, A. Tärnvik, G. Sandström // Infect Immun. – 1991. – P. 3163-8

430 Sjostedt, A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. / A. Sjostedt //Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2007. – V. 1105. – P. 1-29.

431 Snyder, L.A. Microarray genomotyping of key experimental strains of Neisseria gonorrhoeae reveals gene complement diversity and five new neisserial genes associated with Minimal Mobile Elements / L.A. Snyder, J.K. Davies, N.J. Saunders // BMC Genomics. – 2004. – V. 5 – P. 23

432 Soriano, V.E. Typing of Haemophilus paragallinarum strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction / V.E. Soriano, G. Tellez, B.M. Hargis, L. Newberry, C. Salgado-Miranda, J.C. Vázquez // Avian Dis. – 2004. – V. 48 – P. 890-895.

433 Soto, E. Attenuation of the fish pathogen *Francisella* sp. by mutation of the iglC gene / E. Soto, D. Fernandez, J.P. Hawke // J. Aquat Anim. Health. – 2009. – V. 21 – P. 140-9.

434 Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. / E.M. Southern // J Mol Biol. – 1975. – V. 98 – P. 503—517.

435 Splettstoesser, W.D. Re-emergence of *Francisella tularensis* in Germany: fatal tularaemia in a colony of semi-free-living marmosets (Callithrix jacchus) / W.D. Splettstoesser, K. Matz-Rensing, E. Seibold // Epidemiol.

Infect. – 2007. – V. 135. – P. 1256-1265.

436 Sonck, K.A. The proteome of *Salmonella typhimurium* grown under in vivo-mimicking conditions / K.A. Sonck, G. Kint, G. Schoofs, C. Vander Wauven, J. Vanderleyden, S.C. De Keersmaecker // Proteomics. – 2009. – P. 9565-579.

437 Staples, J.E. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964–2004. / J.E. Staples, K.A. Kubota, L.G. Chalcraft // Emerging Infect. Dis. – 2006. – V. 12.– P. 1113-1118.

438 Stenmark, S. Specific antibodies contribute to the host protection against strains of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* / S. Stenmark, H. Lindgren, A. Tarnvik // Microb. Pathog. – 2003. – V. 35. – P. 73-80.

439 Struelens, M.J. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems / M.J. Struelens // Clin. Microbiol. Infect. – 1996. – V. 2 – P. 2-11.

440 Sun, L.V. *Francisella-like* endosymbionts of ticks / L.V. Sun, G.A. Scoles, D. Fish, S.L. O'Neill. // J. Invertebr. Pathol. – 2000. – V. 76 – P. 301–303

441 Surcel, H.-M. Development of *Francisella tularensis* antigen responses measured as T-lymphocyte proliferation and cytokine production (tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukin-2 and -4) during human tularemia / H.-M .Surcel, H. Syrjala, R. Karttunen // Infect. Immun. – 1991. – V. 59. – P. 1948-1953.

442 Surcel, H.M. Membrane proteins of *Francisella tularensis* LVS differ in ability to induce proliferation of lymphocytes from tularemia-vaccinated individuals / H.M. Surcel, M. Sarvas, J.M. Helander, E. Herva // Microbiol. Patogen. – 1989. – V. 7. – P. 411–19.

443 Svensson, K. A Real-Time PCR Array for Hierarchical Identification of Francisella Isolates / K. Svensson, M. Granberg, L. Karlsson, V. Neubauerova, M. Forsman, A. Johansson // PLoS One. – 2009. – V. 4. – P. e8360

444 Svensson, K. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis* / K. Svensson, P. Larsson, D. Johansson // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187. – P. 3903-3908.

445 Sykes, R. The 2009 Garrod Lecture: The evolution of antimicrobial resistance: aDarwinian perspective / R. Sykes // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2010. – V. 65 – P. 1842-1852

446 Sykes, R.B. The β-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β-lactam antibiotics / R.B. Sykes, M. Matthew //J Antimicrob Chemother – 1976. – V. 2 – P. 115-57

447 Taminiau, B. Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis* / B. Taminiau, M. Daykin, S. Swift, M.L. Boschiroli, A. Tibor,P. Lestrate, X. De Bolle, D. O'Callaghan, P. Williams, J.J. Letesson // Infect Immun. – 2002. – V. 70(6). – P. 3004-11.

448 Tärnvik, A. Epidemiological analysis of tularemia in Sweden 1931–1993 /

A. Tärnvik, G. Sandström, A. Sjöstedt // FEMS Immunol Med Microbiol. – 1996. – V. 13 – P. 201–4. 10.1016/0928-8244(95)00104-2

449 Tärnvik, A. Tularaemia in Europe: an epidemiological overview / A. Tärnvik, H.S. Priebe, R. Grunow // Scand J Infect Dis. – 2004. – V. 36. – P. 350 – 5. 10.1080/00365540410020442

450 Tarnvik, A. Nature of protective immunity to *Francisella tularensis*. / A. Tarnvik // Rev. Infect. Dis. – 1989. – V. 11. – P. 440-451.

451 Taylor, A.F. RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity / A.F. Taylor, G.R. Smith // Nature. – 2003. – V. 423. – P. 889–893

452 Taylor, J.P. Epidemiologic characteristics of human tularemia in the southwest-central states, 1981–1987. / J.P. Taylor, G.R. Istre, T.C. McChesney // Am. J. Epidemiol. – 1991. – V. 133. – P. 1032–1038

453 Teanpaisan, R. Molecular fingerprinting of Porphyromonas gingivalis by PCR of repetitive extragenic palindromic (REP) sequences and comparison with other fingerprinting methods / R. Teanpaisan, C.W. Douglas // J Med Microbiol. – 1999. – V. 48. – P. 741-749

454 Teutsch, S.M. Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard / S.M. Teutsch, W.J. Martone, E.W. Brink, M.E. Potter, G. Eliot, R. Hoxsie, R.B. Craven, A.F. Kaufmann // N. Engl. J. Med. – 1979. – V. 301. – P. 826-828.

455 Tezer, H. Tularemia in children, Turkey, September 2009-November 2012 / H. Tezer, A. Ozkaya-Parlakay, H. Aykan // Emerg Infect Dis. – 2015. – V. 21(1). – P. 1-7 doi: 10.3201/eid2101.131127

456 Thelaus, J. Influence of nutrient status and grazing pressure on the fate of *Francisella tularensis* in lake water / J. Thelaus, A. Andersson, P. Mathisen, A.L. Forslund, L. Noppa, M. Forsman // FEMS Microbiol Ecol. – 2009. – V. 67. – P. 69-80. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00612.x

457 Thelaus, J. *Francisella tularensis*subspecies *holarctica* occurs in Swedish mosquitoes, persists through the developmental stages of laboratory-infected mosquitoes and is transmissible during blood feeding / J. Thelaus, A. Andersson, T. Broman, S. Bäckman, M. Granberg, L. Karlsson, K. Kuoppa, E. Larsson, E. Lundmark, J.O. Lundström, P. Mathisen, J. Näslund, M. Schäfer, T. Wahab, M. Forsman // Microb Ecol. – 2014. – V. 67. – P. 96-107. doi:10.1007/s00248-013-0285-1

458 Thjötta, T. Tularemia og dens forekomst i Norge / T. Thjötta // Nord. Med. – 1930. – T. 2. – P. 177-180.

459 Thomas, R.M. Discrimination of Human Pathogenic Subspecies of *Francisella tularensis* by Using Restriction Fragment Length Polymorphism / R. Thomas, A.S. Johansson, B. Neeson, K. Isherwood, A. Sjöstedt, J. Ellis, R.W. .Titball // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – V. 41. – P. 50-57

460 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. Oyston // Infect. Immun. – 2007. – V. 75. – P. 371-378.

461 Titball, R.W. A vaccine for tularaemia / R.W. Titball, P.C.F. Oyston // Exp. Opin. Biol. Ther. – 2003. – V. 3(4).– P. 645-653.

462 Twenhafel, N.A. Pathology of inhalational *Francisella tularensis* spp. *tularensis* SCHU S4 infection in African green monkeys (*Chlorocebus aethiops*) / N.A. Twenhafel, D.A. Alves, B.K. Purcell // Vet. Pathol. – 2009. – V. 46. – P. 698-706.

463 Twine, S. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine / S. Twine, M. Bystrom, W. Chen. // Infect Immun .– 2005. – V. 83. – P. 8345-8352.

464 Twine, S. BALB/c mice, but not C57BL/6 mice immunized with a ΔclpB 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.

465 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.D. Petit // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. - V. 345. – P. 1621-633.

466 Uda, A. Role of pathogenicity determinant protein C (PdpC) in determining the virulence of the *Francisella tularensis* subspecies tularensis SCHU / A. Uda, T. Sekizuka, K. Tanabayashi, O. Fujita, M. Kuroda, A. Hotta, N. Sugiura, N. Sharma, S. Morikawa, A. Yamada // PLoS One. – 2014. - V. 9(2). – P. e89075. doi: 10.1371/journal.pone.008907

467 Ulrich, R.L. Quorum sensing: a transcription regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei* / R.L. Ulrich, D. Deshazer, E.E. Brueggemann, J.A. Jeddeloh // Infect. Immun. – 2004. - V. 72. – P. 6589-6596.

468 Valade, E The PmlI-PmlR quorum-sensing system in Burkholderia pseudomallei plays a key role in virulence and modulates production of the MprA protease / E. Valade, F.M. Thibault, Y.P. Gauthier, M. Palencia, M.Y. Popoff, D.R. Vidal //J Bacteriol. – 2004. - V. 186(8). – P. 2288-94.

469 Versage, J.L. Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens / J.L. Versage, D.M. Severin, M.C. Chu, J.M. Petersen // J. Clin. Microbiol. – 2003. – V. 41 – P. 5492-5499.

470 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(2) – P. 289–297.

471 Vinogradov, E. Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. / E. Vinogradov, M.B. Perry, J.W. Conlan, // Eur J

Biochem. – 2002. – V. 269 – P. 6112-6118.

472 Vogler, A.J. Phylogeography of *Francisella tularensis*: Global Expansion of a Highly Fit Clone / A.J. Vogler // J Bacteriol. – 2009. – V. 191 – P. 2474–2484

473 Vogler, A.J. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis* / A.J. Vogler, D. Birdsell, D.M. Wagner, P. Keim. // Lett. Appl. Microbiol. – 2009. – V. 48 – P. 140-4.

474 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. McKee, G. Sandstrom, C.R. Bolt, M.J. England, G.O. Nelson, J.C. Williams // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 1995. – V. 2. – P. 143-148.

475 Walsh, T.R. Emerging carbapenemases: a global perspective / T.R. Walsh // Int. J. Antimicrob. Agents – 2010. – V. 36. – P. S8–S14.

476 Washburn, A.M. The changing picture of tularemia transmission in Arkansas / A.M. Washburn, J.H. Tocky. // South. Med. J. – 1949. – V. 42. – P. 60-62.

477 Webb, E.C. editor. Enzyme nomenclature / E.C. Webb // London: Academic Press Inc. Ltd. – 1984. – P. 366-74.

478 Wehrly, T.D. Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages / T.D. Wehrly, A. Chong, K. Virtaneva // Celli J.Cell Microbiol. – 2009. – V. 11(7). – P. 1128-50. doi: 10.1111/j.1462-5822

479 Weiss, D.S. In vivo negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence / D.S. Weiss, A. Brotcke, T. Henry, J.J. Margolis, K. Chan, D.M. Monack// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – V. 104. – P. 6037-6442.

480 Westphal, O. Bacterial Lipopolysaccharides. Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure / O. Westphal, and K. Jann // Methods in Carbohydrate Chemistry. – 1965. – V. 5. – P. 83-91.

481 Whipp, M.J. Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia / M.J Whipp, J.M. Davis, G. Lum // J. Med. Microbiol. – 2003. – V. 52. – P. 839-842.

482 Wilder, J.A. Characterization of aerosol infection with *F. tularensis* Schu S4 in cynomologus macaques and LD_{50} determination / J.A. Wilder, H.C. Gelhaus // in Sixth International Tularemia Conference, Berlin.– 2009. – 127 p.

483 Winzer, K. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria / K. Winzer, P. Williams // Int J Med Microbiol. – 2001. – V. 291(2). – P. 131-43.

484 Wood, W.J. Tularemia; a study based on the incidence of positive agglutination tests against *P. tularensis* in the Indian population of Manitoba and North-Western Ontario / W.J. Wood // Manit. Med. Rev. –

1951. – V. 31. – P. 641-644.

485 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 // Infect. Immun. – 2005. – V. 73. – P. 2644-2654.

486 Wu, T.H. Vaccination of Fischer 344 rats against pulmonary infections by *Francisella tularensis* type A strains / T.H. Wu, J.L. Zsemlye, G. Statom // Vaccine. – 2009. – V. 27(34). – P. 4684-4693.

487 Xiao-Zhe, H. Current Trends in Plague Research: From Genomics to Virulence / H. Xiao-Zhe, M.P. Nikolich, L.E. Lindler // Clinical Medicine & Research. – 2006. – V. 4(3). – P. 189-199.

488 Yu, J.J. *Francisella tularensis* T-cell antigen identification using humanized HLA-DR4 transgenic mice / J.J. Yu, T. Goluguri, M. Guentzel // Clin. Vaccine Immunol. – 2010. – V. 17. – P. 215-222.

489 Yu, J.J. The presence of infectious extracellular *Francisella tularensis* subsp. *Novicida* in murine plasma after pulmonary challenge / J.J. Yu, E.K. Raulie, A.K. Murthy // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2008. – V. 27. – P. 323-325.

490 Zhang, F. Detection of *Francisella tularensis* in ticks and identification of their genotypes using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis / F. Zhang, W. Liu, X. Wu, Z-T. Xin, Q-M. Zhao, H. Yang, W-C. Cao // BMC Microbiol. – 2008. – V. 8. – P. 152.

491 Zhang, D. Lymphotoxin-alpha plays only a minor role in host resistance to respiratory infection with virulent type A *Francisella tularensis* in mice. / D. Zhang, R. Kuolee, G. Harris // Mediators Inflamm. – 2008. –V. 6. – P. 239-740.

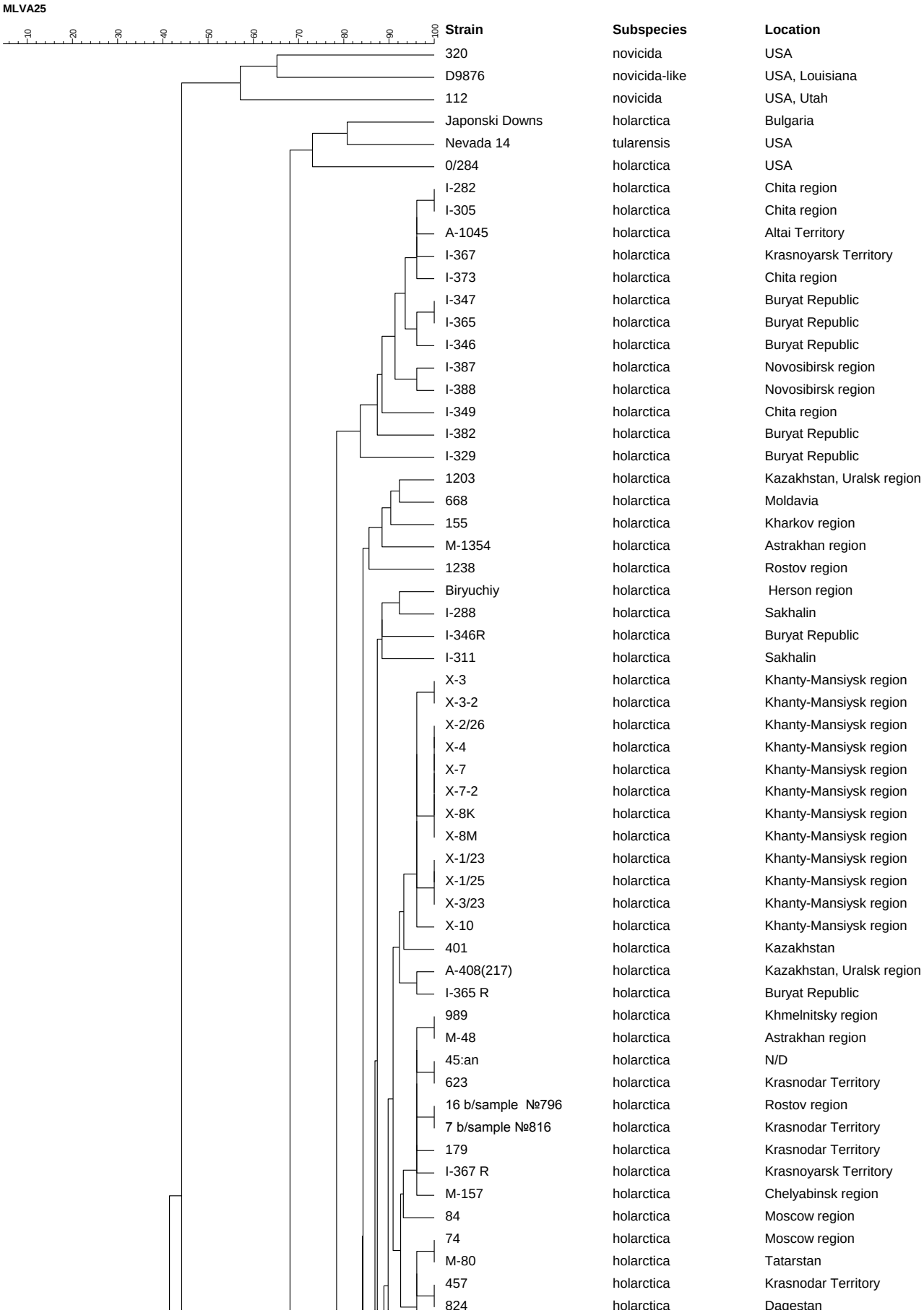
492 Zhou, D. Identification of signature genes for rapid and specific characterization of *Yersinia pestis* / D. Zhou, Y. Han, E. Dai, D. Pei, Y. Song, J. Zhai, Z. Du, J. Wang, Z. Guo, R. Yang // Microbiol Immunol. – 2004. – V. 48. – P. 263-269.

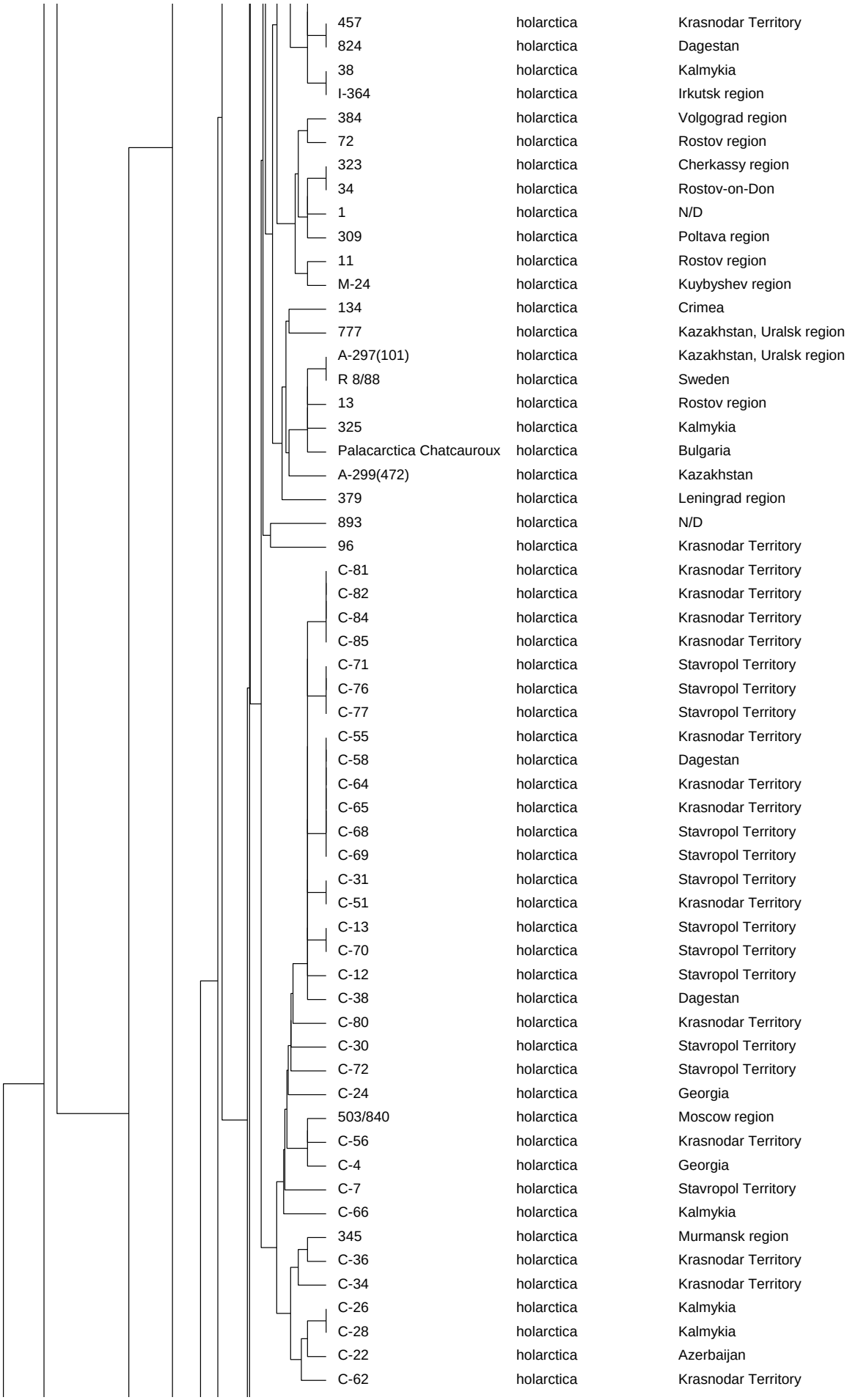
493 Zhou, D. DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation / D. Zhou, Y. Han, Y. Song, Z. Tong, J. Wang, Z. Guo, D. Pei, X. Pang, J. Zhai, M. Li, B. Cui, Z. Qi, L. Jin, R. Dai, Z. Du, J. Bao, X. Zhang, J. Yu, J. Wang, P. Huang, R. Yang // J Bacteriol. – 2004b –V. 186. – P. 5138-5146.

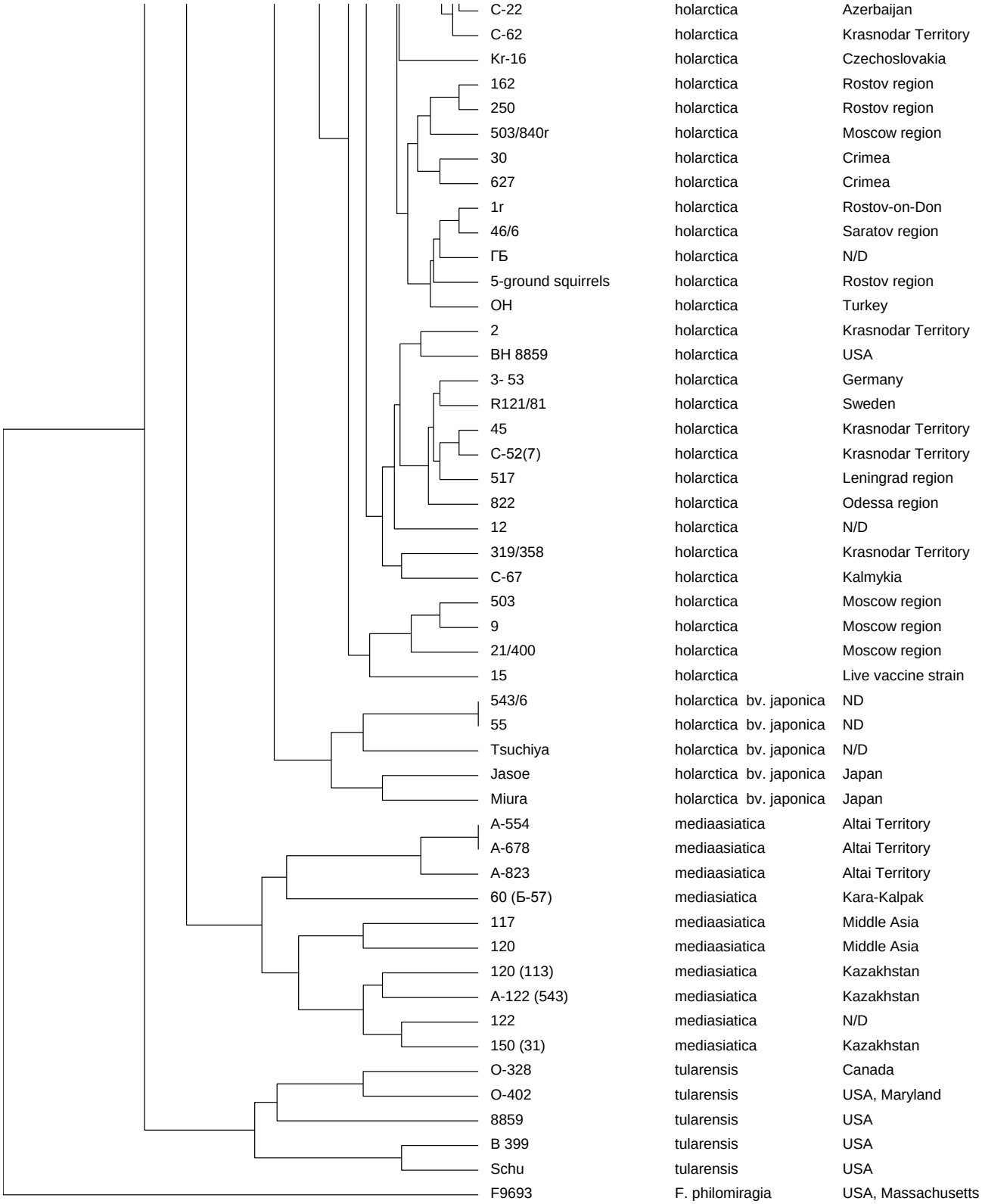
494 Zhu, J Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae* / J. Zhu,M.B. Miller, R.E. Vance, M. Dziejman, B.L. Bassler, J.J. Mekalanos. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2002. – V. 99(5). – P. 3129-34.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

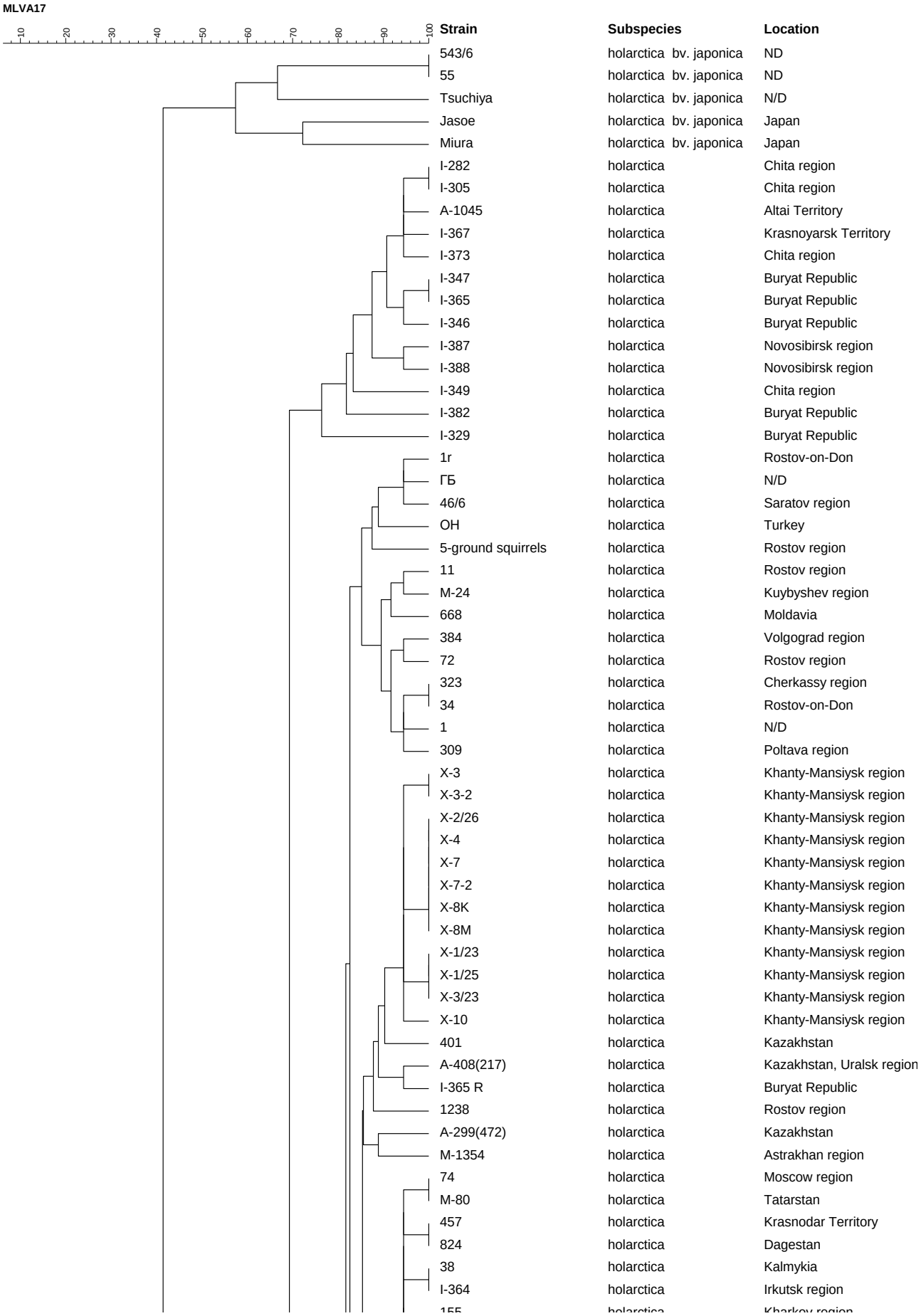
Филогенетическое дерево, построенное по 25 локусам по алгоритму UPGMA

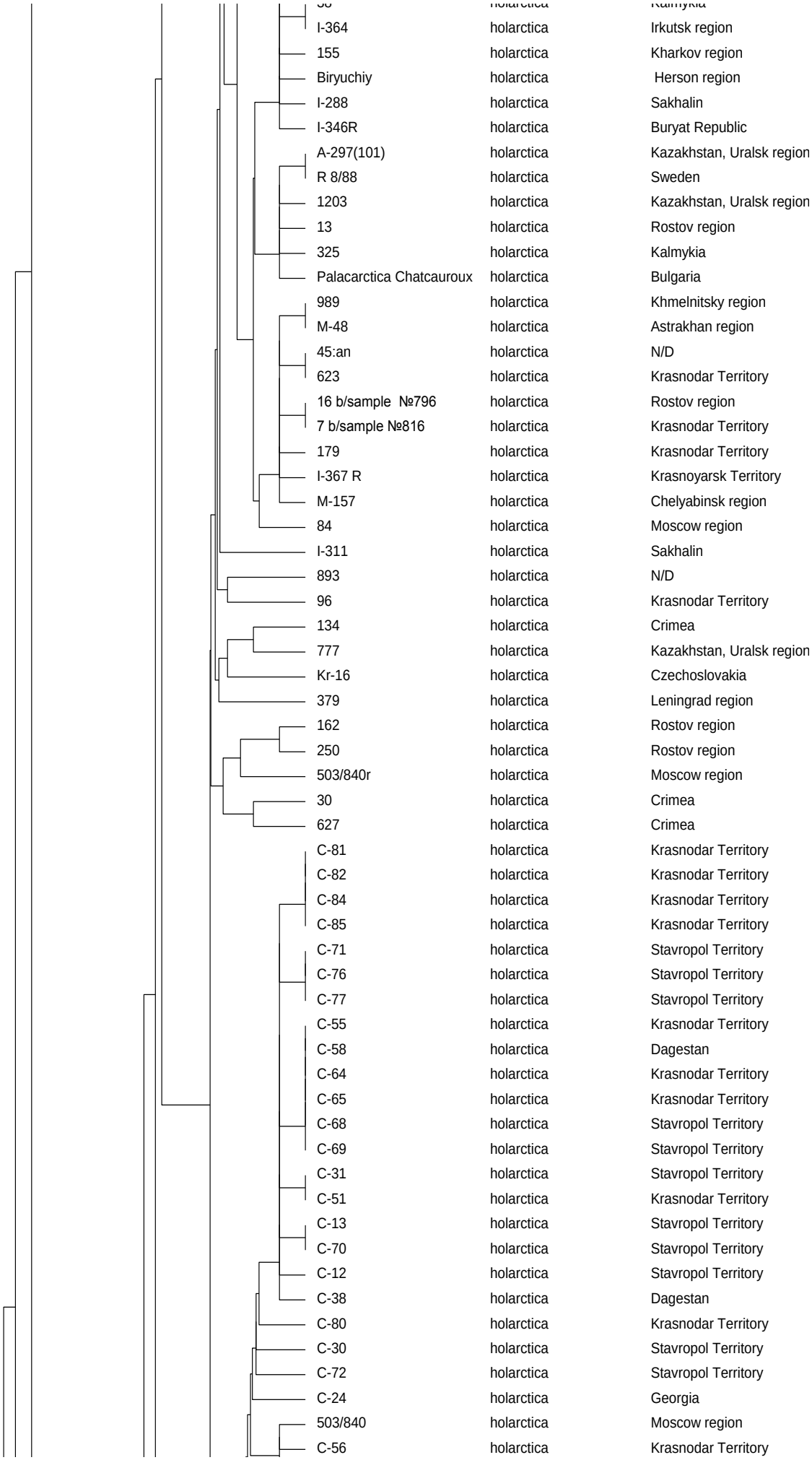


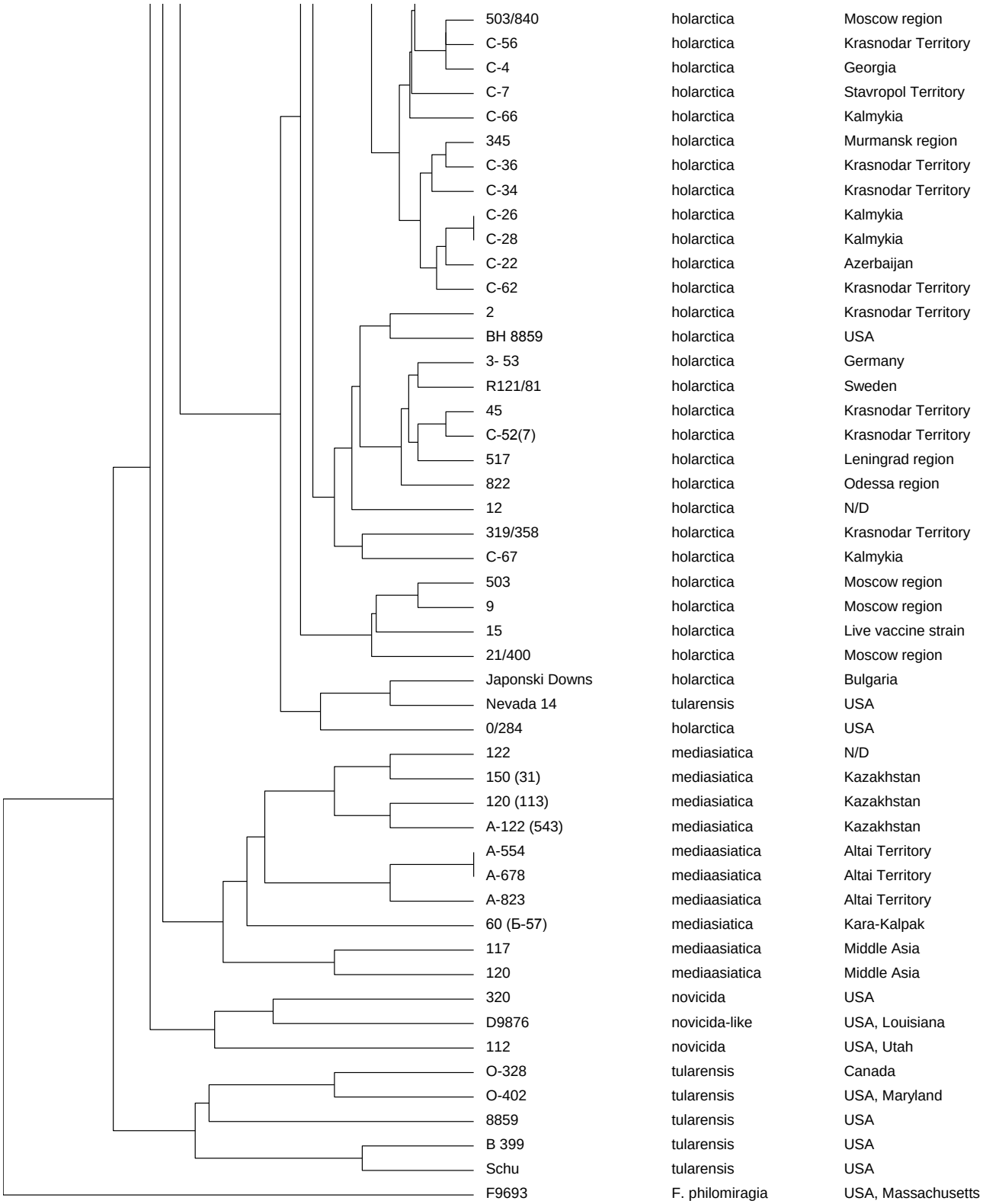

457 holarctica Krasnodar Territory
824 holarctica Dagestan
38 holarctica Kalmykia
I-364 holarctica Irkutsk region
384 holarctica Volgograd region
72 holarctica Rostov region
323 holarctica Cherkassy region
34 holarctica Rostov-on-Don
1 holarctica N/D
309 holarctica Poltava region
11 holarctica Rostov region
M-24 holarctica Kuybyshev region
134 holarctica Crimea
777 holarctica Kazakhstan, Uralsk region
A-297(101) holarctica Kazakhstan, Uralsk region
R 8/88 holarctica Sweden
13 holarctica Rostov region
325 holarctica Kalmykia
Palacarctica Chatcauroux holarctica Bulgaria
A-299(472) holarctica Kazakhstan
379 holarctica Leningrad region
893 holarctica N/D
96 holarctica Krasnodar Territory
C-81 holarctica Krasnodar Territory
C-82 holarctica Krasnodar Territory
C-84 holarctica Krasnodar Territory
C-85 holarctica Krasnodar Territory
C-71 holarctica Stavropol Territory
C-76 holarctica Stavropol Territory
C-77 holarctica Stavropol Territory
C-55 holarctica Krasnodar Territory
C-58 holarctica Dagestan
C-64 holarctica Krasnodar Territory
C-65 holarctica Krasnodar Territory
C-68 holarctica Stavropol Territory
C-69 holarctica Stavropol Territory
C-31 holarctica Stavropol Territory
C-51 holarctica Krasnodar Territory
C-13 holarctica Stavropol Territory
C-70 holarctica Stavropol Territory
C-12 holarctica Stavropol Territory
C-38 holarctica Dagestan
C-80 holarctica Krasnodar Territory
C-30 holarctica Stavropol Territory
C-72 holarctica Stavropol Territory
C-24 holarctica Georgia
503/840 holarctica Moscow region
C-56 holarctica Krasnodar Territory
C-4 holarctica Georgia
C-7 holarctica Stavropol Territory
C-66 holarctica Kalmykia
345 holarctica Murmansk region
C-36 holarctica Krasnodar Territory
C-34 holarctica Krasnodar Territory
C-26 holarctica Kalmykia
C-28 holarctica Kalmykia
C-22 holarctica Azerbaijan
C-62 holarctica Krasnodar Territory


C-22 holarctica Azerbaijan
C-62 holarctica Krasnodar Territory
Kr-16 holarctica Czechoslovakia
162 holarctica Rostov region
250 holarctica Rostov region
503/840r holarctica Moscow region
30 holarctica Crimea
627 holarctica Crimea
1r holarctica Rostov-on-Don
46/6 holarctica Saratov region
ГБ holarctica N/D
5-ground squirrels holarctica Rostov region
OH holarctica Turkey
2 holarctica Krasnodar Territory
BH 8859 holarctica USA
3- 53 holarctica Germany
R121/81 holarctica Sweden
45 holarctica Krasnodar Territory
C-52(7) holarctica Krasnodar Territory
517 holarctica Leningrad region
822 holarctica Odessa region
12 holarctica N/D
319/358 holarctica Krasnodar Territory
C-67 holarctica Kalmykia
503 holarctica Moscow region
9 holarctica Moscow region
21/400 holarctica Moscow region
15 holarctica Live vaccine strain
543/6 holarctica bv. japonica ND
55 holarctica bv. japonica ND
Tsuchiya holarctica bv. japonica N/D
Jasoe holarctica bv. japonica Japan
Miura holarctica bv. japonica Japan
A-554 mediaasiatica Altai Territory
A-678 mediaasiatica Altai Territory
A-823 mediaasiatica Altai Territory
60 (Б-57) mediasiatica Kara-Kalpak
117 mediaasiatica Middle Asia
120 mediaasiatica Middle Asia
120 (113) mediasiatica Kazakhstan
A-122 (543) mediasiatica Kazakhstan
122 mediasiatica N/D
150 (31) mediasiatica Kazakhstan
O-328 tularensis Canada
O-402 tularensis USA, Maryland
8859 tularensis USA
B 399 tularensis USA
Schu tularensis USA
F9693 F. philomiragia USA, Massachusetts

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Филогенетическое дерево, построенное по 17 локусам по алгоритму UPGMA




I-364 holarctica Irkutsk region
155 holarctica Kharkov region
Biryuchiy holarctica Herson region
I-288 holarctica Sakhalin
I-346R holarctica Buryat Republic
A-297(101) holarctica Kazakhstan, Uralsk region
R 8/88 holarctica Sweden
1203 holarctica Kazakhstan, Uralsk region
13 holarctica Rostov region
325 holarctica Kalmykia
Palacarctica Chatcauroux holarctica Bulgaria
989 holarctica Khmelnitsky region
M-48 holarctica Astrakhan region
45:an holarctica N/D
623 holarctica Krasnodar Territory
16 b/sample №796 holarctica Rostov region
7 b/sample №816 holarctica Krasnodar Territory
179 holarctica Krasnodar Territory
I-367 R holarctica Krasnoyarsk Territory
M-157 holarctica Chelyabinsk region
84 holarctica Moscow region
I-311 holarctica Sakhalin
893 holarctica N/D
96 holarctica Krasnodar Territory
134 holarctica Crimea
777 holarctica Kazakhstan, Uralsk region
Kr-16 holarctica Czechoslovakia
379 holarctica Leningrad region
162 holarctica Rostov region
250 holarctica Rostov region
503/840r holarctica Moscow region
30 holarctica Crimea
627 holarctica Crimea
C-81 holarctica Krasnodar Territory
C-82 holarctica Krasnodar Territory
C-84 holarctica Krasnodar Territory
C-85 holarctica Krasnodar Territory
C-71 holarctica Stavropol Territory
C-76 holarctica Stavropol Territory
C-77 holarctica Stavropol Territory
C-55 holarctica Krasnodar Territory
C-58 holarctica Dagestan
C-64 holarctica Krasnodar Territory
C-65 holarctica Krasnodar Territory
C-68 holarctica Stavropol Territory
C-69 holarctica Stavropol Territory
C-31 holarctica Stavropol Territory
C-51 holarctica Krasnodar Territory
C-13 holarctica Stavropol Territory
C-70 holarctica Stavropol Territory
C-12 holarctica Stavropol Territory
C-38 holarctica Dagestan
C-80 holarctica Krasnodar Territory
C-30 holarctica Stavropol Territory
C-72 holarctica Stavropol Territory
C-24 holarctica Georgia
503/840 holarctica Moscow region
C-56 holarctica Krasnodar Territory


503/840 holarctica Moscow region
C-56 holarctica Krasnodar Territory
C-4 holarctica Georgia
C-7 holarctica Stavropol Territory
C-66 holarctica Kalmykia
345 holarctica Murmansk region
C-36 holarctica Krasnodar Territory
C-34 holarctica Krasnodar Territory
C-26 holarctica Kalmykia
C-28 holarctica Kalmykia
C-22 holarctica Azerbaijan
C-62 holarctica Krasnodar Territory
2 holarctica Krasnodar Territory
BH 8859 holarctica USA
3- 53 holarctica Germany
R121/81 holarctica Sweden
45 holarctica Krasnodar Territory
C-52(7) holarctica Krasnodar Territory
517 holarctica Leningrad region
822 holarctica Odessa region
12 holarctica N/D
319/358 holarctica Krasnodar Territory
C-67 holarctica Kalmykia
503 holarctica Moscow region
9 holarctica Moscow region
15 holarctica Live vaccine strain
21/400 holarctica Moscow region
Japonski Downs holarctica Bulgaria
Nevada 14 tularensis USA
0/284 holarctica USA
122 mediasiatica N/D
150 (31) mediasiatica Kazakhstan
120 (113) mediasiatica Kazakhstan
A-122 (543) mediasiatica Kazakhstan
A-554 mediaasiatica Altai Territory
A-678 mediaasiatica Altai Territory
A-823 mediaasiatica Altai Territory
60 (Б-57) mediasiatica Kara-Kalpak
117 mediaasiatica Middle Asia
120 mediaasiatica Middle Asia
320 novicida USA
D9876 novicida-like USA, Louisiana
112 novicida USA, Utah
O-328 tularensis Canada
O-402 tularensis USA, Maryland
8859 tularensis USA
B 399 tularensis USA
Schu tularensis USA
F9693 F. philomiragia USA, Massachusetts