

Свойства бактерий *F. tularensis subsp. holarctica*, лишенных способности синтезировать белок igIC

А.Н.Мокриевич, В.М.Павлов, Г.М.Вахрамеева, Р.И.Миронова,
Т.И.Комбарова, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, И.А.Дятлов

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

Получен вариант референс-штамма *F. tularensis subsp. holarctica* 503 с делетированными двумя копиями гена *igIC* – *F. tularensis* 3m/23-2. Этот штамм авирулентен для мелких лабораторных животных и обладает сниженной способностью размножаться в мышиных макрофагах по сравнению с вакцинным штаммом 15 НИИЭГ. В организме экспериментальных мышей бактерии штамма 3m/23-2 сохранили способность к диссеминации от места введения до селезенки, но потеряли способность к размножению в этом органе. Иммунизация мышей линии BALB/c штаммом 3m/23-2 защищала экспериментальных животных от последующего заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* как подвида *holarctica*, так и подвида *tularensis*. Уровень защиты был дозозависимым и зависел от подвида возбудителя туляремии.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, подвид *holarctica*, ген *igIC*, фагоцитоз, протективность

Для цитирования: Мокриевич А.Н., Павлов В.М., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Дятлов И.А. Свойства бактерий *F. tularensis subsp. holarctica*, лишенных способности синтезировать белок *igIC*. Бактериология. 2017; 2(4): 17–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-17-24

Properties of *F. tularensis subsp. holarctica* bacteria deprived the ability to synthesize *igIC* protein

A.N.Mokrievich, V.M.Pavlov, G.M.Vakhrameeva, R.I.Mironova,
T.I.Kombarova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, I.A.Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation

The strain *F. tularensis* 3m/23-2 has been constructed from the reference strain *F. tularensis subsp. holarctica* 503, by deleting of two copies of the *igIC* gene. The strain is avirulent for small laboratory animals and has a reduced ability to proliferate in murine macrophages compared to the vaccine strain 15 NIEG. Bacteria of the strain 3m/23-2 retained their ability to disseminate from the site of injection to the spleen in the mice, but lost the ability to reproduce in the organ itself. Immunization of BALB/c mice with strain 3m/23-2 provided protection for animals against subsequent infection with *F. tularensis* virulent strains both of subspecies *holarctica* and *tularensis*. The level of protection was dose-dependent and relied upon a subspecies of the causative agent of tularemia.

Keywords: *Francisella tularensis*, subspecies *holarctica*, *igIC* gene, phagocytosis, protectivity

For citation: Mokrievich A.N., Pavlov V.M., Vakhrameeva G.M., Mironova R.I., Kombarova T.I., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Dyatlov I.A. Properties of *F. tularensis subsp. holarctica* bacteria deprived the ability to synthesize *igIC* protein. Bacteriology. 2017; 2(4): 17–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-17-24

F *tularensis* – факультативный внутриклеточный паразит, вызывающий туляремию у людей и восприимчивых теплокровных животных. Уникальной особенностью возбудителя туляремии является его способность проникать в макрофаги *F. tularensis* по особому механизму эндоцито-

за [1] и быстро перемещаться из фагосомы в цитозоль, где происходит его интенсивное размножение [2]. При достижении определенной концентрации микроорганизма в цитозоле запускается апоптоз инфицированной клетки [3]. Бактерии со связанными фрагментами компонентов макрофа-

Для корреспонденции:

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0117

E-mail: mokrievich@obolensk.org

Статья поступила 11.11.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, head of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

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

Phone: (4967) 36-0117

E-mail: mokrievich@obolensk.org

The article was received 11.11.2017, accepted for publication 22.12.2017

гов выходят во внеклеточную среду организма и повторно захватываются фагоцитами [4].

Бактерии *F. tularensis* для перемещения из фагосомы в цитозоль используют систему секреции типа VI [2]. Одним из ключевых элементов этой системы является белок IgIC. Белок IgIC кодируется геном *iglC*, представленным в геномах бактерий *F. tularensis* эпидемически значимых подвидов *tularensis*, *holarctica* и *mediasiatica* двумя копиями, а в подвиде *novicida* – одной копией [5]. В других представителях рода *Francisella* ген *iglC* также присутствует в единственной копии.

Удаление обеих копий гена *iglC* в вакцинном штамме 15 НИИЭГ, штаммах LVS и Schu приводило к их полной аттенуации для экспериментальных мышей различных генетических линий [6–8]. Эти штаммы были не способны защищать экспериментальных мышей от последующего заражения вирулентными бактериями *F. tularensis* [7, 8]. Однако до настоящего времени отсутствует информация о протективных свойствах варианта природного штамма подвида *holarctica*, лишенного способности экспрессировать белок IgIC.

Целью настоящей работы является создание и изучение свойств бактерий *F. tularensis* подвида *holarctica* без генов *iglC*.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и плазмиды. Перечень штаммов и плазмид, использованных в работе, представлен в таблице.

Условия культивирования. Штаммы *E. coli* выращивали при температуре 37°C в среде Лурия–Бертани (LB) [10] (на агаре или в бульоне), при необходимости в среду добавляли антибиотики (100 мкг мл⁻¹ ампициллина или 20 мкг мл⁻¹ хлорамфеникола). Штаммы *F. tularensis* выращивали при температуре 37°C на плотной (FTA) и в жидкой (FTB) питательных средах. Состав FTA: эритроцит-агар – 3,8%, высушенная кровь крупного рогатого скота – 1%, глюкоза – 1%, цистеин – 0,05%, тиамин хлорид – 0,0025%, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Московская обл.). Состав FTB: ферментативный гидролизат казеина – 2%, дрожжевой экстракт – 1%, КН₂РO₄ – 1,2%, глюкоза – 1%, цистеин – 0,001%, FeCl₂ – 0,001%, pH 7,2 [11]. При необходимости в среду добавляли 100 мкг мл⁻¹ полимиксина В и 6 мкг мл⁻¹ хлорамфеникола.

Животные. В работе использовали аутбредных мышей Swiss Webster, мышей линий BALB/c(H2d), C57BL6 (возраст – 6–8 нед, вес – 18–20 г, питомник «Пущино», ФИБХ, г. Пущино, МО) и морских свинок (возраст – 5–7 нед, вес – 350–450 г, питомник «Андреевка», ГНЦ БМТ, п. Андреевка, Солнечногорский р-н, МО). Работы с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации [12] и Директивой Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [13]. Содержание и манипуляции с животными выполняли в виварии, соответствующем требованиям GAC (Good Animal Care) и протоколу № P03-20 комитета по биоэтике ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.

Модификация генома туляремии микроба. Удаление генов *iglC* из хромосомы бактерий *F. tularensis* проводили по ранее разработанной методике [6, 7, 9]. Праймеры для вы-

явления модифицированного участка генома *F. tularensis* без нуклеотидной последовательности гена *iglC* – IGKF: 5'-AAGGATAAGACCTGTCGT-3' и IGKR: 5'-TTGAAACCATACC GGGTA-3' были синтезированы в ЗАО «Синтол», Москва.

Фагоцитоз. Эксперименты по фагоцитозу проводили по ранее описанной методике [9]. Мышинные макрофагоподобные клетки линии J744.1A были получены из Российской коллекции клеточных культур, г. С.-Петербург, Россия. Перитонеальные макрофаги мышей линии BALB/c получали с помощью пятикратного промывания брюшной полости фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 0,1% глюкозы.

Заражение лабораторных животных. Вирулентность штаммов *F. tularensis* определяли на биологической модели инбредной линии мышей BALB/c обоего пола. Животным (по 5 особей в группе) вводили подкожно по 0,2 мл 10-кратных разведений бактериальных суспензий. За животными наблюдали в течение 28 дней. Погибших мышей вскрывали, селезенки гомогенизировали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) и суспензии клеток высевали на среду FTA с полимиксином. Величину LD₅₀ определяли по методу Kerber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [14].

Персистенция штаммов *F. tularensis* в селезенках мышей. Экспериментальным животным вводили подкожно клетки исследуемых штаммов *F. tularensis* в дозе 3 × 10¹ КОЕ

Таблица. Бактериальные штаммы и плазмиды		
Название	Характеристика	Источник или ссылка
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	<i>subsp. holarctica</i> , вакцинный штамм	«ГКПМ-Оболенск»
<i>F. tularensis</i> 15 R	<i>subsp. holarctica</i> , вариант штамма 15 НИИЭГ, дефектного по ЛПС	«ГКПМ-Оболенск»
<i>F. tularensis</i> 503	<i>subsp. holarctica</i> , вирулентный референс-штамм	«ГКПМ-Оболенск»
<i>F. tularensis</i> Schu	<i>subsp. tularensis</i> , природный штамм	«ГКПМ-Оболенск»
<i>F. tularensis</i> 15/23-2	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ с двумя делетированными копиями гена <i>iglC</i>	[9]
<i>F. tularensis</i> 3m/23-2	<i>F. tularensis</i> 503 с двумя делетированными копиями гена <i>iglC</i>	Данная работа
<i>E. coli</i> S17-1 λ pir	(<i>thi pro hsdR⁺ hsdM⁺ recA</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7(Tp ^R Sm ^R)); лизогенный вариант штамма S17-1, продуцирующий π -белок, необходимый для репликации плазмид, содержащих <i>ori6K</i>	«ГКПМ-Оболенск»
<i>E. coli</i> S17(pPV2)	штамм S17-1 λ pir с векторной плазмидой pPV, Amp ^R , Cm ^R	[6]
<i>E. coli</i> S17(pPVΔ <i>iglC</i>)	штамм S17-1 λ pir с рекомбинантной плазмидой pPVΔ23, Amp ^R , Cm ^R	[6]
pPV2	суицидный вектор для <i>F. tularensis</i> , Amp ^R , Cm ^R , <i>sacB</i> , <i>mob</i>	[6]
pPVΔ <i>iglC</i>	рекомбинантная суицидная плазида для <i>F. tularensis</i> со встроенной 3.0 п.о. областью генома <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ с делетированным геном <i>iglC</i> , Amp ^R , Cm ^R , <i>sacB</i> , <i>mob</i>	[6]

для штаммов 15 НИИЭГ и в дозе 1×10^6 КОЕ для штаммов 15/23-2 и 3м/23-2. Через 4, 7, 14 и 21 сут животных эвтаназировали, селезенки гомогенизировали и суспендировали в объеме 5 мл ЗФР. Из полученной взвеси готовили ряд десятикратных разведений и суспензии высевали на среду ФТА. Подсчет выросших на агаре колоний проводили через 72 ч.

Протективность. Количественную оценку способности исследуемых штаммов защищать животных от подкожного заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* проводили с использованием вирулентного тест-штамма *F. tularensis* 503 и природного штамма *F. tularensis* Schu. Животных, иммунизированных подкожно разными дозами исследуемого штамма (от 1×10^6 до 1×10^9 КОЕ/мышь), заражали 3×10^3 КОЕ вирулентного штамма. За животными наблюдали в течение 28 сут.

Устойчивость бактерий к нормальной кроличьей сыворотке (НКС). Нормальную кроличью сыворотку получали по стандартной методике [15]. Аликвоты сывороток до использования хранили при температуре минус 20°C. Стандартную суспензию бактерий в ЗФР готовили из ночной агаровой культуры по стандарту мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ НЦЭСМП) и разводили в ЗФР до концентрации 1×10^7 КОЕ/мл. 0,1 мл бактериальной суспензии смешивали с 0,9 мл НКС и инкубировали при температуре 37°C в течение 18 ч. Количество выживших в НКС клеток определяли высевом из соответствующих разведений на среду ФТА, содержащую 100 мкг мл⁻¹ полимиксина. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 72 ч.

Результаты и обсуждение

Созданные ранее молекулярные инструменты для аллельного обмена в хромосоме *F. tularensis* позволили ранее создать варианты вакцинного штамма 15 НИИЭГ и LVS, а также варианты природных штаммов подвида *tularensis* и *novicida* с делетированными генами *iglC* [6, 7, 9, 16]. Делеционные варианты, в отличие от исходных штаммов, были авирулентны для лабораторных мышей [6, 7, 8, 16]. Для сравнительного изучения свойств мутантных штаммов подвида *holarctica*, как природных, так и вакцинного, без генов *iglC*, методом аллельного обмена был создан вариант природного штамма *F. tularensis subsp. holarctica* 503, не содержащий данные гены. Модифицированный штамм получили с использованием суицидной плазмиды pPVΔ*iglC* по ранее разработанной двухэтапной методике [6]. Селекцию клонов без одной и двух копий гена *iglC* проводили с помощью ПЦР ДНК из колоний конъюгатов, способных расти на среде с сахарозой. В ПЦР использовали проверочные праймеры IGKF и IGKR. На первом этапе по удалению одной копии гена *iglC* из хромосомы туляремиального микроба было проанализировано 100 образцов ДНК клонов, из которых 6 давали ампликоны размером 545 п.о. и размером 1000 п.о., то есть содержали одну делеционную копию фрагмента хромосомы с геном *iglC* и одну природную копию. Для проведения второго этапа был взят один из 6 клонов, в клетки которого методом мобилизационного переноса была повторно введена плазида pPVΔ*iglC*. Среди 100 клонов, выросших на среде с сахарозой, 3 клон давали ампликоны размером только 545 п.о., то есть не со-

держали участков хромосомы с геном *iglC*. Сравнение роста отобранных колоний с бактериями штамма *F. tularensis* 503 на плотных и жидких питательных средах не выявило достоверных различий в размерах колоний через 48 ч роста и скорости роста в жидкой питательной среде (время удвоения ~ 2 ч). Для дальнейшего анализа был выбран один клон без двух копий гена *iglC*, обозначенный как *F. tularensis* 3м/23-2.

Определение выживаемости штамма *F. tularensis* 3м/23-2 в нормальной кроличьей сыворотке

Для изучения влияния продукта гена *iglC* на способность клеток природного и вакцинного штаммов выживать в НКС была проведена серия опытов по оценке устойчивости штаммов *F. tularensis* 3м/23-2 и 15/23-2 к НКС. В качестве контроля был использован штамм 15 НИИЭГ, а в качестве чувствительного к НКС – штамм 15 R. Бактерии штамма 15 НИИЭГ полностью сохраняли свою жизнеспособность в НКС, а бактерии штамма 15 R погибали. Модифицированные штаммы 3м/23-2 и 15/23-2 сохранялись в НКС так же, как и штамм 15 НИИЭГ. Полученные данные указывают на отсутствие влияния продукта гена *iglC* на способность бактерий *F. tularensis* выживать в НКС.

Фагоцитоз экспериментальных штаммов

Для изучения влияния продукта гена *iglC* на способность бактерий подвида *holarctica* проникать и размножаться в клетках мышиной макрофагоподобной линии J774A.1 и перитонеальных мышинных макрофагах была проведена серия опытов по фагоцитозу штаммов *F. tularensis* 3м/23-2 и 15/23-2. В качестве штамма сравнения был использован вакцинный штамм 15 НИИЭГ (рис. 1).

Штамм 3м/23-2 умеренно размножался в течение 24 ч как в клетках линии J774A.1, так и в перитонеальных мышинных макрофагах, однако уровень размножения был более чем на порядок ниже по сравнению с уровнем размножения бактерий штамма 15 НИИЭГ (см. рис. 1). Мутантный штамм 15/23-2, созданный на основе вакцинного штамма 15 НИИЭГ, практически не размножался в макрофагах. Из полученных данных следует, что: а) продукт гена *iglC* необходим для внутримакрофагального размножения вакцинного туляремиального штамма; б) модифицированный природный штамм содержит некие структуры или обладает механизмами, позволяющими компенсировать отсутствие продукта гена *iglC* для размножения в макрофагах.

Вирулентность штамма 3м/23-2

Подкожное введение мышам линии BALB/c и морским свинкам бактериальной суспензии штамма 3м/23-2 в дозах от 1×10^2 до 1×10^8 КОЕ не приводило к гибели животных за период наблюдения (30 дней). Для сравнения, в группе мышей линии BALB/c при подкожном введении вакцинного штамма 15 НИИЭГ в дозе 30 КОЕ и группе морских свинок при введении в дозе 1×10^9 КОЕ фиксировали гибель отдельных особей из групп.

Мыши линии C57BL/6 крайне чувствительны к бактериям туляремиального микроба. Они погибают от единичных клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [15]. Для проверки патогенных свойств штамма *F. tularensis* 3м/23-2 для

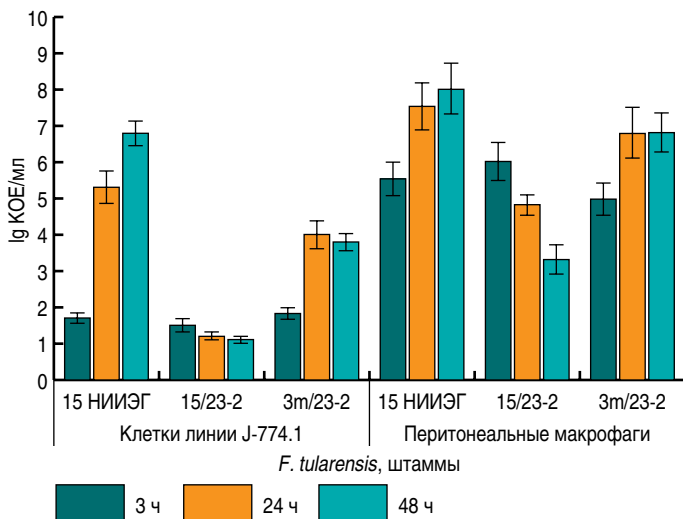


Рис. 1. Фагоцитоз штаммов *F. tularensis* в макрофагах. Высев бактерий проводили из 0,5 мл суспензии макрофагов, лизированных 0,05% раствором дезоксихолата натрия.

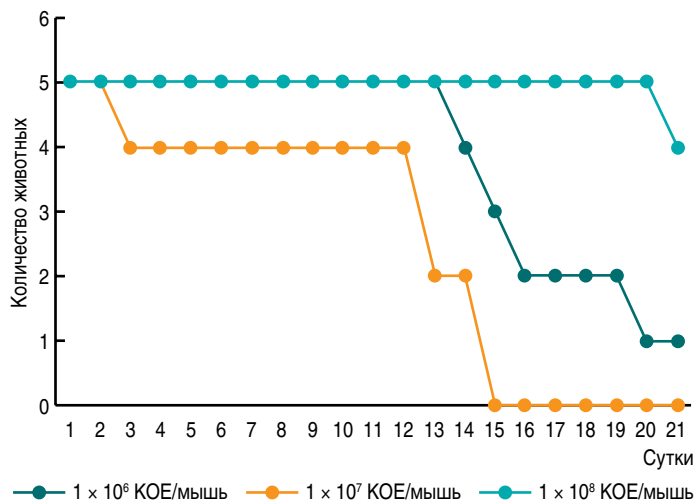


Рис. 2. Временная диаграмма сроков гибели животных.

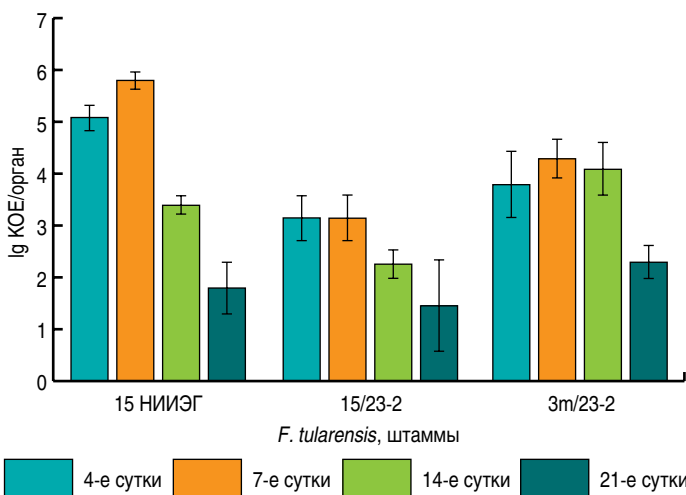


Рис. 3. Персистенция туляремиального микроба в селезенках мышей линии BALB/c. Группы мышей иммунизировали подкожно дозами 1×10^2 КОЕ штамма 15 НИИЭГ и 1×10^6 КОЕ штаммов 15/23-2 и 3m/23-2. Количество бактерий в селезенке определяли через 4, 7, 14 и 21 суток после инфицирования. Результаты показаны как значение Lg КОЕ/орган $\pm$ доверительный интервал ($p < 0,05$).

данной высокочувствительной модели экспериментальной туляремии три группы мышей линии C57BL6 (по 5 особей в группе) заражали подкожно штаммом *F. tularensis* 3m/23-2 дозами 1×10^6 , 1×10^7 и 1×10^8 КОЕ/животное и наблюдали в течение 22 сут (рис. 2).

Мыши линии C57BL6 выживали при заражении штаммом *F. tularensis* 3m/23-2 дозами менее 1×10^4 КОЕ (данные не приведены), что указывает на его сниженную вирулентность по сравнению с вакцинным штаммом в данной модели туляремии. Другой особенностью штамма 3m/23-2 является тот факт, что при дозе заражения мышей линии C57BL6, равной 1×10^8 КОЕ/животное, 80% экспериментальных мышей остались живыми в течение 22 сут наблюдения, тогда как при дозе 1×10^7 КОЕ они погибали к 15-му дню наблюдения (рис. 2).

Делеция генов *iglC* из хромосомы *F. tularensis* подвида *holarctica* приводила к появлению практически авирулентного для мелких лабораторных животных штамма. Данный факт был отмечен ранее для вариантов вакцинного штамма 15 НИИЭГ и LVS без генов *iglC* [6, 8], что указывает на важную роль белка *iglC* в патогенезе туляремиального микроба.

Персистенция штамма 3m/23-2 в селезенках лабораторных мышей

Хотя мыши линии BALB/c не погибали от высоких доз штамма, в органах животных обнаруживались живые бактерии туляремиального микроба. Данные по персистенции бактерий штамма 3m/23-2 в селезенках экспериментальных мышей, определенные через 4, 7, 14 и 21 сут после инфицирования, приведены на рисунке 3. Для сравнения на этом рисунке представлены результаты экспериментов по персистенции вакцинного штамма 15 НИИЭГ и его производного 15/23-2.

Из представленных данных видно, что удаление двух копий гена *iglC* из хромосомы штамма 503 приводило к потере способности бактерий размножаться в селезенке экспериментальных мышей, но при этом сохранялась способность модифицированного штамма диссеминировать от места введения возбудителя в селезенку, причем уровень обсемененности селезенки практически не менялся от 4 до 14 сут. К 21-му дню обсемененность снизилась на 2 порядка. Сходным образом диссеминировал и сохранялся в селезенке модифицированный вариант вакцинного штамма без двух копий гена *iglC*, однако степень диссеминации в данном случае была на порядок ниже, хотя двум группам мышей вводили одну и ту же дозу бактерий (1×10^6 КОЕ). В отличие от модифицированных штаммов у мышей, инфицированных штаммом 15 НИИЭГ, наблюдали как диссеминацию, так и размножение в селезенках. Максимальную обсемененность селезенки этой группы мышей наблюдали на 7-е сутки после заражения, затем количество бактерий снижалось и к 21-м суткам падало на 4 порядка относительно максимального уровня. В отличие от штаммов 15 НИИЭГ и 15/23-2, единичные живые бактерии штамма *F. tularensis* 3m/23-2 обнаруживали в селезенках мышей вплоть до 64-го дня.

При высева на твердую питательную среду гомогената селезенки выживших мышей линии C57BL6, иммунизированных дозой 1×10^8 КОЕ, было выявлено, что все селе-

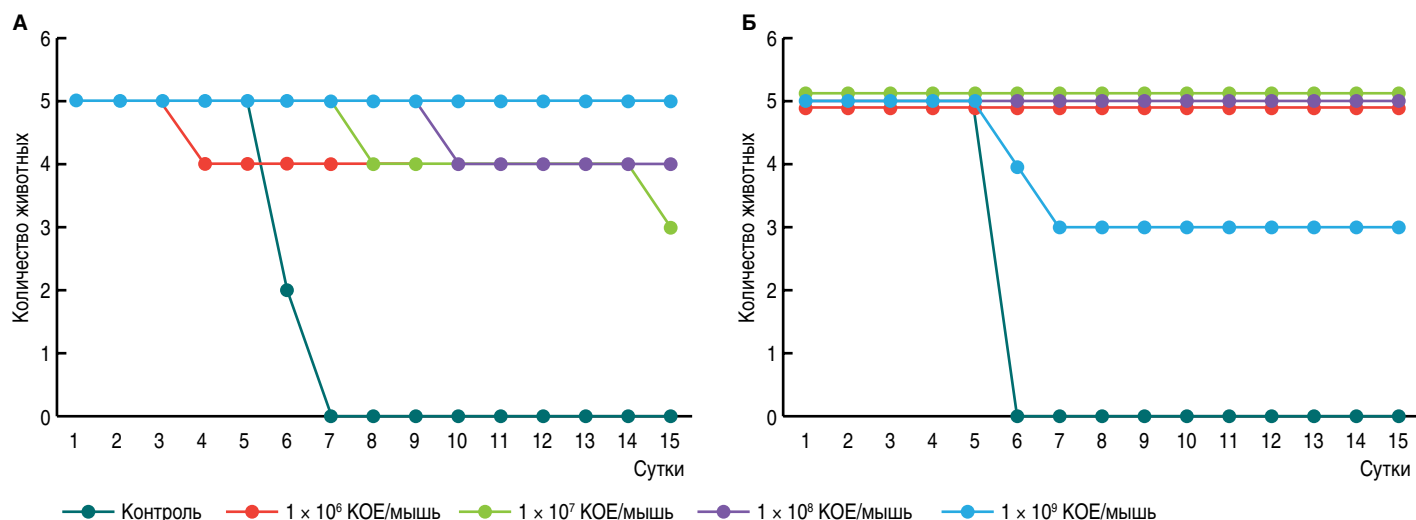


Рис. 4. Протективность штамма *F. tularensis* 3m/23-2 для аутбредных мышей. Группы мышей (по 5 особей) иммунизировали подкожно дозами от 1×10^6 до 1×10^9 КОЕ/мышь. Для заражения использовали штамм *F. tularensis* 503 в дозах: А – 30 КОЕ, Б – 3000 КОЕ.

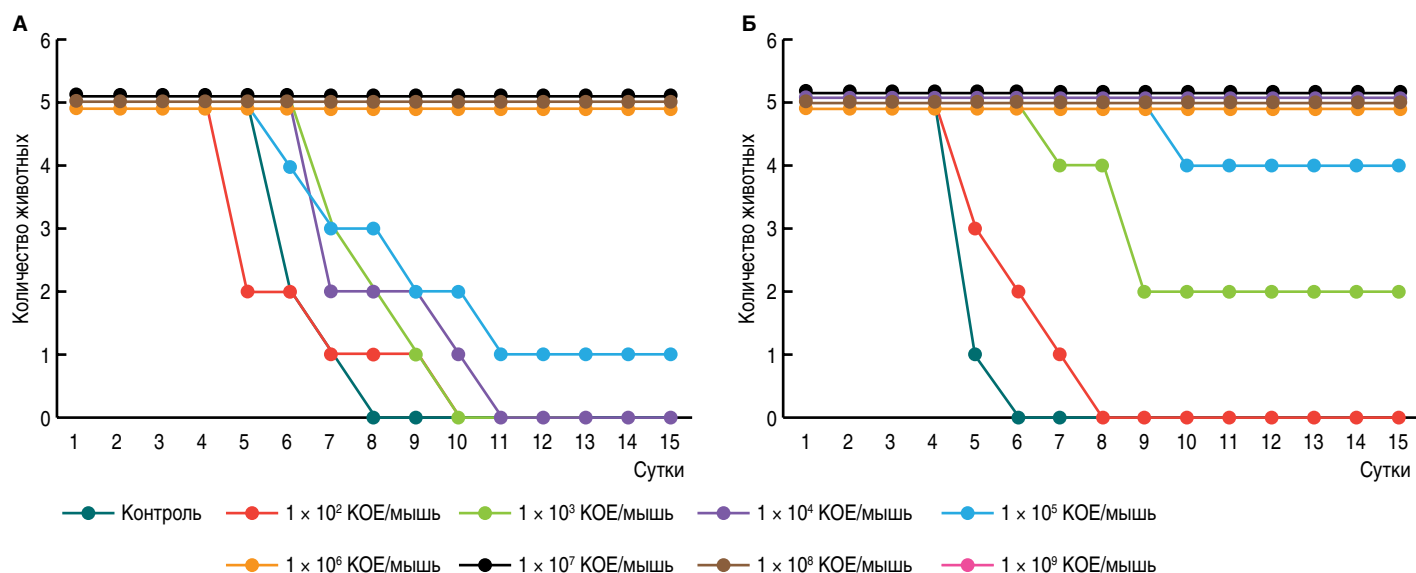


Рис. 5. Протективность штамма *F. tularensis* 3m/23-2 для мышей линии BALB/c. Группы мышей (по 5 особей) иммунизировали подкожно дозами от 1×10^2 до 1×10^9 КОЕ/мышь. Для заражения использовали штаммы *F. tularensis* Schu (А) и 503 (Б) 503 в дозе 1×10^3 КОЕ.

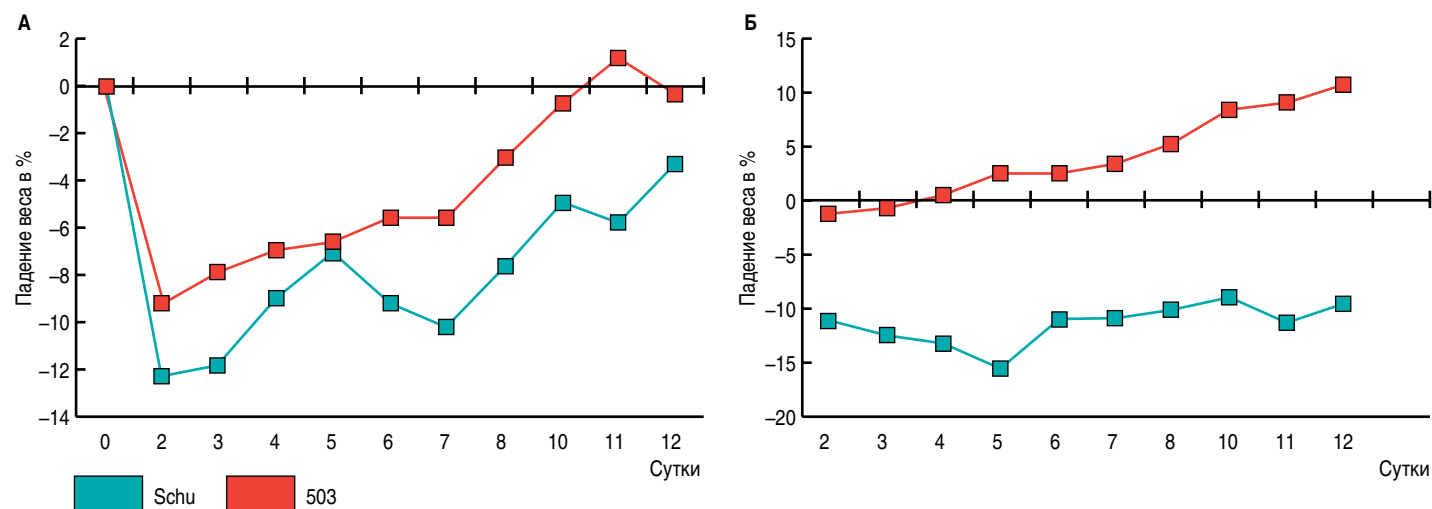


Рис. 6. Изменения веса иммунных мышей линии BALB/c после заражения штаммами 503 и Schu. Для иммунизации групп мышей использовали штамм *F. tularensis* 3m/23-2 в дозе 1×10^6 КОЕ (А) и штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 22 КОЕ (Б).

зенки содержали бактерии заражающего штамма. Среднее количество клеток возбудителя в селезенках было $(2 \pm 0,5) \times 10^4$ КОЕ/орган. Для сравнения, группа мышей линии C57BL6, иммунизированных штаммом 15/23-2 дозой 1×10^8 КОЕ, к 22-м суткам не содержала в селезенках клеток туляремийного микроба.

Протективные свойства штамма 3m/23-2

Группы морских свинок, иммунизированных штаммом 3m/23-2 дозами 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 КОЕ/животное подкожно, были полностью защищены от последующего подкожного заражения 3×10^3 КОЕ вирулентного штамма 503. В контрольной группе морских свинок все животные погибли от той же дозы возбудителя туляремии. Животные погибали с 6-е по 12-е сутки.

Протективные свойства штамма 3m/23-2 были изучены на аутбредных мышах (рис. 4) и мышах линии BALB/c (рис. 5).

Четыре группы аутбредных мышей (по 5 особей в группе) иммунизировали подкожно дозами 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 КОЕ/мышь соответственно. Через 28 сут после иммунизации они были заражены подкожно вирулентным штаммом *F. tularensis* 503 дозами 30 и 3000 КОЕ/животное. Иммунизированные животные были полностью защищены от дозы 30 КОЕ, если они были иммунизированы штаммом 3m/23-2 в дозе 1×10^9 КОЕ, и защищены только частично при меньших дозах иммунизации (рис. 4А). Иную картину наблюдали, когда для заражения использовали дозу 3000 КОЕ. Имунные мыши (дозы иммунизации от 1×10^6 до 1×10^8) были полностью защищены от гибели, а мыши, иммунизированные дозой 1×10^9 КОЕ, были защищены только частично (рис. 4Б).

Делеционный вариант вакцинного штамма 15 НИИЭГ без обеих копий гена *iglC* был не способен формировать у белых мышей защиту от последующего заражения штаммом 503 [8].

В экспериментах по заражению групп линейных мышей BALB/c, предварительно иммунизированных штаммом *F. tularensis* 3m/23-2, вирулентными штаммами двух подвигов: *subsp. holarctica* (штамм 503) и *subsp. tularensis* (штамм Schu), были получены данные о различной зависимости протективности изучаемого штамма от дозы иммунизации при последующем подкожном заражении штаммами 503 и Schu (рис. 5А, Б).

Из рисунка 5 видно, что введение мышам 1×10^3 КОЕ бактерий штамма Schu приводило к гибели более половины животных, если они были предварительно иммунизированы дозами менее 1×10^6 КОЕ, тогда как при заражении штаммом 503 такую гибель наблюдали при дозах иммунизации менее 1×10^5 КОЕ.

Имунные животные по-разному реагировали на заражение штаммами 503 и Schu. Динамика изменения веса экспериментальных мышей (рис. 6А) указывает на более тяжелый инфекционный процесс у животных, зараженных штаммом Schu, по сравнению со штаммом 503. Сходную картину наблюдали и для групп животных, предварительно иммунизированных вакцинным штаммом (рис. 6Б).

Созданный в данной работе штамм *F. tularensis subsp. holarctica* 3m/23-2 без двух копий гена *iglC* практически авирулентен для лабораторных животных (мышей и морских свинок). Однако клетки данного штамма сохраняют жизне-

способность при 18-часовой инкубации в НКС и умеренно размножаются как в макрофагоподобных клетках линии J771.A1, так и в перитонеальных макрофагах. Свойства мутантного штамма 15/23-2 без двух копий гена *iglC*, созданного на основе вакцинного штамма 15 НИИЭГ, также относящегося к подвиду *holarctica*, практически не отличаются от свойств штамма 3m/23-2, за исключением полной потери способности к внутримакрофагальному размножению. Полученные результаты указывают на критичность неограниченной способности бактерий размножаться в макрофагах для вирулентности *F. tularensis*. Можно также предположить, что повышенная способность бактерий вакцинного штамма 15 НИИЭГ размножаться в макрофагах по сравнению с бактериями штамма 3m/23-2 объясняет их остаточную вирулентность для экспериментальных мышей.

Иммунизация мышей линии BALB/c штаммом 3m/23-2 приводит к формированию определенной протективности экспериментальных животных к последующему заражению вирулентными штаммами как подвида *holarctica*, так и подвида *tularensis*. Штаммы *F. tularensis subsp. holarctica* LVS и 15 НИИЭГ, а также и *F. tularensis subsp. tularensis* Schu без обеих копий гена *iglC*, в отличие от штамма *F. tularensis subsp. holarctica* 3m/23-2, потеряли данную способность [6, 7, 8].

Интересен факт, что дозы иммунизации мышей штаммом 3m/23-2, необходимые для защиты животных от последующего заражения штаммами Schu (*subsp. tularensis*) и 503 (*subsp. holarctica*), отличаются на два порядка. Вероятно, это связано с необходимостью более выраженного гуморального иммунного ответа для защиты животных от бактерий подвида *tularensis*.

Мутантный штамм подвида *tularensis* без двух копий гена *iglC* Schu S4 Δ *iglC*, полученный на основе штамма *F. tularensis* Schu S4, при подкожном введении дозы 1×10^6 КОЕ персистирует в зоне введения, но внутрикожная иммунизация этим штаммом, в отличие от иммунизации LVS, удлинняет только на 2 дня время жизни экспериментальных мышей линии BALB/c после подкожного заражения дозой 500 КОЕ высоковирулентного штамма подвида *tularensis* [7]. Внутрикожная иммунизация другим авирулентным вариантом Schu S4 с делетированным опероном *pur* (Schu S4 Δ *purMCD*) приводила также только к удлинению сроков жизни животных на 2,6 дня при интраназальном заражении дозой 500 КОЕ штамма Schu S4 [17].

Таким образом, полученные нами данные указывают на способность аттенуированных в результате делеции генов *iglC* штаммов подвида *holarctica* формировать протективный иммунитет на мышинной модели экспериментальной туляремии, тогда как, по литературным данным, аттенуированные штаммы подвида *tularensis* такими свойствами не обладают.

Работа выполнена в рамках НИР 048 «Изучение механизмов патогенеза и иммуногенеза туляремийной инфекции и мониторинг за циркуляцией возбудителя в отдельных регионах Российской Федерации» Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемноориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

Литература

1. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. Infect Immun. 2005 Sep;73(9):5892-902. DOI: 10.1128/IAI.73.9.5892-5902.2005
2. Bröms JE, Sjöstedt A, Lavander M. The role of the *Francisella tularensis* pathogenicity island in type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling. Front Microbiol. 2010 Dec 21;1:136. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00136
3. Lai XH, Sjöstedt A. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. Infect Immun. 2003 Aug;71(8):4642-6.
4. Checroun C, Wehrly TD, Fischer ER, Hayes SF, Celli J. Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Sep 26;103(39):14578-83.
5. Barker JR, Klose KE. Molecular and Genetic Basis of Pathogenesis in *Francisella tularensis*. Ann N Y Acad Sci. 2007 Jun;1105:138-59. DOI: 10.1196/annals.1409.010
6. Golovliov I, Sjöstedt A, Mokrievich A, Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. FEMS Microbiol Lett. 2003 May 28;222(2):273-80.
7. Twine S, Byström M, Chen W, Forsman M, Golovliov I, Johansson A, et al. 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. Infect Immun. 2005 Dec;73(12):8345-52. DOI: 10.1128/IAI.73.12.8345-8352.2005
8. Мокриевич АН, Вахрамеева ГМ, Миронова РИ, Комбарова ТИ, Титарева ГМ, Кравченко ТБ, и др. Создание и изучение вариантов вакцинного штамма *Francisella tularensis* без генов igIC. Сообщение 2. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;4(118):102-5. DOI:10.21055/0370-1069-2013-4-102-105
9. Мокриевич АН, Вахрамеева ГМ, Миронова РИ, Комбарова ТИ, Титарева ГМ, Кравченко ТБ, и др. Создание и изучение вариантов вакцинного штамма *Francisella tularensis* без генов igIC. Сообщение 1. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;3(117):70-4. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-3-70-74
10. Miller JH. Experiments in Molecular Genetics. Gold Spring Harbor Lab., Gold Spring Harbor, New York, 1972, 466 p.
11. Лапин АА, Павлов ВМ, Мокриевич АН, Домотенко ЛВ, Храмов МВ. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2009;4(102):66-7.
12. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 №18713) 2010, 22 с.
13. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2010, 48 с.
14. Ашмарин ИП, Воробьев АА. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962, 180 с.
15. Комбарова ТИ, Павлов ВМ, Кравченко ТБ, Титарева ГМ, Бахтеева ИВ, Борзилов АИ, и др. Сравнительная оценка реактогенности туляремийной вакцины на различных биомоделях. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013;4(71):54-62.
16. Lauriano CM, Barker JR, Nano FE, Arulanandam BP, Klose KE. Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. FEMS Microbiol Lett. 2003 Dec 12;229(2):195-202.
17. Pechous RD, McCarthy TR, Mohapatra NP, Soni S, Penoske RM, Salzman NH, et al. A *Francisella tularensis* Schu S4 purine auxotroph is highly attenuated in mice but offers limited protection against homologous intranasal challenge. PLoS One. 2008 Jun 25;3(6):e2487. DOI: 10.1371/journal.pone.0002487
2. Bröms JE, Sjöstedt A, Lavander M. The role of the *Francisella tularensis* pathogenicity island in type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling. Front Microbiol. 2010 Dec 21;1:136. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00136
3. Lai XH, Sjöstedt A. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. Infect Immun. 2003 Aug;71(8):4642-6.
4. Checroun C, Wehrly TD, Fischer ER, Hayes SF, Celli J. Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Sep 26;103(39):14578-83.
5. Barker JR, Klose KE. Molecular and Genetic Basis of Pathogenesis in *Francisella tularensis*. Ann N Y Acad Sci. 2007 Jun;1105:138-59. DOI: 10.1196/annals.1409.010
6. Golovliov I, Sjöstedt A, Mokrievich A, Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. FEMS Microbiol Lett. 2003 May 28;222(2):273-80.
7. Twine S, Byström M, Chen W, Forsman M, Golovliov I, Johansson A, et al. 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. Infect Immun. 2005 Dec;73(12):8345-52. DOI: 10.1128/IAI.73.12.8345-8352.2005
8. Mokrievich AN, Vakhrameeva GM, Mironova RI, Kombarova TI, Bakhteeva IV, Titareva GM, et al. Construction and Investigation of the Variants of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* Lacking igIC Genes. Communication 2. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2013;4(102):102-105. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-102-105 (In Russian).
9. Mokrievich AN, Vakhrameeva GM, Mironova RI, Kombarova TI, Titareva GM, Kravchenko TB, et al. Construction and Investigation of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* without igIC genes. Communication 1. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2013;3(117):70-74. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-3-70-74. (In Russian).
10. Miller JH. Experiments in Molecular Genetics. Gold Spring Harbor Lab., Gold Spring Harbor, New York, 1972, 466 p.
11. Lapin AA, Pavlov VM, Mokrievich AN, Domotenko LV, Khramov MV. Simple Liquid Nutrient Medium for Molecular Genetic Investigations of *Francisella tularensis*. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2009;4(102):66-7. (In Russian).
12. The order of the health Ministry of the Russian Federation dated 23.08.2010 No. 708н "On approval of Rules for laboratory practice" (Registered in the Ministry of justice 13.10.2010 No. 18713) 2010, 22 p. (In Russian).
13. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union for the protection of animals used for scientific purposes. St. Petersburg, 2010, 48 p. (In Russian).
14. Ashmarin IP, Vorob'ev AA. Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh [Statistical methods in microbiological research]. L.: Mesgiz "Publ., 1962, 180 p. (In Russian).
15. Kombarova TI, Pavlov VM, Kravchenko TB, Titareva GM, Bakhteeva IV, Borzilov AI, et al. Comparative Evaluation of Reactogenicity Tularemia Vaccine Using of Different Biomodels. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2013;4(71):54-62. (In Russian).
16. Lauriano CM, Barker JR, Nano FE, Arulanandam BP, Klose KE. Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. FEMS Microbiol Lett. 2003 Dec 12;229(2):195-202.
17. Pechous RD, McCarthy TR, Mohapatra NP, Soni S, Penoske RM, Salzman NH, et al. A *Francisella tularensis* Schu S4 purine auxotroph is highly attenuated in mice but offers limited protection against homologous intranasal challenge. PLoS One. 2008 Jun 25;3(6):e2487. DOI: 10.1371/journal.pone.0002487

References

Информация об авторах:

Павлов Виталий Михайлович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ
Телефон: (4967) 36-0003

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

Миронова Раиса Ивановна, научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

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

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

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

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Information about authors:

Vitaliy M. Pavlov, MD, PhD, DSc, head of the laboratory of microbiology of tularemia of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Galina M. Vakhrameeva, researcher of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Raisa I. Mironova, researcher of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Tatyana I. Kombarova, PhD (Biol), senior researcher of the biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Irina V. Bakhteeva, MD, PhD, senior researcher of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Galina M. Titareva, MD, PhD, senior researcher of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med), Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

НОВОСТИ НАУКИ

Недопустимы никакие контакты и распространения

Clostridium difficile – это бактерия, которая может вызвать сильный понос за счет выработки токсинов. Ученые из Техасского Университета, США, открыли путь, посредством которого гены бактерии совместно нарабатывают эти токсины. По мере того, как *C. difficile* становится все более и более устойчивой к нынешнему поколению антибиотиков, это открытие может потенциально привести к появлению новых методов лечения вызванных микробом инфекций, таких как предотвращение совместно работающих генов и избавление их от способности продуцировать вызывающие болезнь токсины.

Darkoh C. et al. 2016.

Accessory Gene Regulator-1 Locus Is Essential for Virulence and Pathogenesis of Clostridium difficile.
mBio 7, e01237-16. DOI: 10.1128/mBio.01237-16

Война бактерий и людей

На фестивале науки «Кстати», организованном новосибирским Информационным центром по атомной энергии, известный российский биоинформатик, заместитель директора Института проблем передачи информации имени А.А.Харкевича РАН доктор биологических наук Михаил Сергеевич Гельфанд прокомментировал это документальное кино, а также рассказал, насколько реальна угроза устойчивости бактерий к антибиотикам.

Наука в Сибири. Война бактерий и людей. Наука в Сибири [Электронный ресурс].
URL: <http://www.sbras.info/articles/simply/voina-bakterii-i-lyudei>.