

## Иммуногенность и реактогенность штамма *Francisella tularensis* 15/23-1 recA – кандидата для создания новой живой туляремийной вакцины

А.Н. Мокриевич (mokrievich@obolensk.org), Г.М. Титарева, Т.И. Комбарова, Е.А. Ганина, Т.Б. Кравченко, И.В. Бахтеева, Г.М. Вахрамеева, Р.И. Миронова, А.И. Борзилов (borzilov@obolensk.org), О.В. Коробова, В.М. Павлов (vitpav@obolensk.org), И.А. Дятлов (dyatlov@obolensk.org)

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», г. Оболensk

### Резюме

Штамм *F. tularensis* 15/23-1 recA, отличающийся от вакцинного штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ отсутствием одной из двух копий гена *iglC* и гена *recA*, обладает сниженной реактогенностью для экспериментальных животных (мышей линии BALB/c и морских свинок): менее выражены транзиторное снижение веса, а также лейкопения и тромбоцитопения в первую неделю после иммунизации, чем у вакцинного штамма. В сыворотке крови мышей, иммунизированных штаммом 15/23-1 recA, концентрация гамма-интерферона через 7 суток была в 5 раз меньше, чем у мышей, иммунизированных штаммом 15 НИИЭГ. Вирулентность модифицированного штамма для мышей более чем на два порядка меньше, чем для штамма 15 НИИЭГ. По данным гистологических исследований, штамм *F. tularensis* 15/23-1 recA стимулирует морфологически более выраженную иммунную перестройку в селезенке и лимфатических узлах по сравнению со штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Отличием штамма 15/23-1 recA от вакцинного является то, что он не обнаруживается в селезенках экспериментальных животных на 21 сутки после иммунизации. В обоих вариантах уровень антитуляремийных антител в сыворотках иммунизированных мышей и морских свинок практически одинаков, также не было обнаружено достоверных отличий в количестве гамма-интерферона, синтезированного спленocyтами мышей при специфической индукции. Протективный иммунитет длительностью более 180 суток, формируемый штаммами, защищает мышей от подкожного заражения вирулентным туляремийным штаммом 503 (subsp. *holarctica*).

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, *iglC*, *recA*, вакцинный штамм, реактогенность, иммуногенность

### Immunogenicity and Reactogenicity of *Francisella tularensis* Strain 15/23-1 recA – the Candidate for a New Live Tularemia Vaccine

A.N. Mokrievich (mokrievich@obolensk.org), G.M. Titareva, T.I. Kombarova, E.A. Ganina, T.B. Kravchenko, I.V. Bakhteeva, G.M. Vakhrameeva, R.I. Mironova, A.I. Borzilov (borzilov@obolensk.org), O.V. Korobova, V.M. Pavlov (vitpav@obolensk.org), I.A. Dyatlov (dyatlov@obolensk.org)

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

### Abstract

*F. tularensis* strain 15/23-1 recA is different from the vaccine strain *F. tularensis* line 15 NIEG by lacking one from the two copies of *iglC* gene and *recA* gene has reduced its reactogenicity for experimental animals (BALB/c mice and guinea pigs): transient weight reduction is less expressed, as well as leukopenia and thrombocytopenia during the first week after the immunization, compared to vaccine strain. The concentration of gamma-interferon in mice blood serum after 7 days immunized with strain 15/23-1 recA, was 5 times less than in mice immunized with strain 15 NIEG. The virulence of the modified strain for mice is less than for the strain 15 NIEG by more than two orders of magnitude. According to histological studies *F. tularensis* strain 15/23-1 recA stimulates morphologically a more expressed immune rearrangement in the spleen and lymph nodes as compared to *F. tularensis* strain 15 NIEG. The difference of strain 15/23-1 recA from vaccine is that it is not detected in the spleens of experimental animals at 21 days after immunization. The level of specific antibodies in sera of immunized mice and guinea pigs were almost identical in both variants and there was no significant difference in the amount of gamma interferon synthesized by splenocytes of mice under specific induction. Immune mice were protected against subcutaneous challenge with virulent strain of tularemia 503 (subsp. *holarctica*) and protective immunity formed by the strains was lasting more than 180 days.

**Key words:** *Francisella tularensis*, *iglC*, *recA*, vaccine strain, reactogenicity, immunogenicity

### Введение

Бактерии *Francisella tularensis* являются возбудителями туляремии – особо опасной инфекции, регулярно встречающейся в разных регио-

нах Российской Федерации. В настоящее время для профилактики туляремии используется живая вакцина, созданная на основе штамма *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 15 линии НИИЭГ. Штамм

*F. tularensis* 15 линии НИИЭГ является вариантом штамма 15, первоначально полученного в 40-х годах прошлого века в результате селекции низко-вирулентных вариантов туляремийного микроба из природных штаммов *F. tularensis* [1]. Туляремийная вакцина у людей создает длительный напряженный иммунитет, однако обладает определенной реактогенностью [2] и нестабильностью [1]. Наблюдаемая реактогенность туляремийной вакцины ограничивает ее применение для вакцинации детей и людей с ослабленным иммунитетом, поэтому работы по созданию новой, менее реактогенной вакцины весьма актуальны [3].

Ранее нами был создан штамм *F. tularensis* 15/23-1 recA в результате делеции одного из двух генов *igIC* (отвечают за размножение в макрофагах) и делеции гена *recA* (отвечает за способность к гомологичной рекомбинации) в штамме 15 линии НИИЭГ [4]. Штамм *F. tularensis* 15/23-1 recA отличает от штамма 15 сниженная способность размножаться в макрофагах и в паренхиматозных органах инфицированных мышей, а также сниженная физиологическая реакция, проявляющаяся в меньшем транзитном падении веса.

**Цель настоящего исследования** – сравнительный анализ штаммов *F. tularensis* 15/23-1 recA и 15 НИИЭГ по иммуногенности, реактогенности и остаточной вирулентности с использованием, мышей линии BALB/c и морских свинок.

#### Материалы и методы

**Штаммы.** Природные штаммы *F. tularensis* ssp. *holarctica* 503 и ssp. *tularensis* Schu, вакцинный штамм 15 НИИЭГ и штамм 15/23-1 recA [4] были получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ), г. Оболенск). Культуры *F. tularensis* выращивали на плотной питательной среде «FT-агар» (ГНЦ ПМБ) при температуре 37 °С. Стандартные суспензии клеток туляремийного микроба (5 × 10<sup>9</sup> КОЕ/мл для вакцинного штамма 15 НИИЭГ и штамма 15/23-1 recA, 1 × 10<sup>10</sup> КОЕ/мл для природного штамма 503) готовили в забуференном физиологическом растворе (ЗФР): 0,15 М натрия хлористого и 0,015 М калий-натриевого фосфатного буфера, pH 7,4 (ЗФР) с использованием стандарта мутности (СОС 42-28-85-2012, Научный центр экспертизы средств медицинского применения – НЦЭСМП).

**Животные.** В работе использовали мышей линии BALB/c(H2<sup>d</sup>) (ФИБХ Питомник «Пушино», МО, г. Пушино, вес – 18 – 20 г, возраст – 6 – 8 недель) и морских свинок («Андреевка», ГНЦ БМТ, МО, Солнечногорский р-н, п. Андреевка, вес – 350 – 450 г, возраст – 5 – 7 недель). Работы с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации [5] и Директивой Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [6].

**Иммунизация животных.** Экспериментальных мышей иммунизировали подкожно 0,2 мл суспензии клеток штамма 15 НИИЭГ и 15/23-1 recA в дозах 5 × 10<sup>4</sup> и 1 × 10<sup>2</sup> КОЕ соответственно. Морских свинок иммунизировали подкожно 0,5 мл суспензии, содержащей 1 × 10<sup>8</sup> КОЕ для каждого штамма. За иммунизированными животными наблюдали 28 (мыши) и 35 суток (морские свинки).

#### Определение персистенции бактерий *F. tularensis* в организме лабораторных животных.

На 4-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки после иммунизации проводили эвтаназию животных, селезенки гомогенизировали и суспендировали в 5 мл ЗФР. Из полученной взвеси готовили ряд десятикратных разведений и проводили высевы на FT-агар. Подсчет колоний осуществляли через 72 ч инкубации посевов при температуре 37 °С.

#### Определение веса лабораторных животных после иммунизации.

Взвешивание животных (весы с пределами взвешивания от 0 до 3 кг и точностью 0,1 г) проводили ежедневно в одно и то же время до 21-х суток после иммунизации. Морских свинок взвешивали индивидуально, мышей – группами по 5 животных.

#### Определение гематологических показателей крови.

Забор крови у животных проводили на 4-е, 7-е, 11-е и 21-е сутки после иммунизации. Животных за 1 сутки до манипуляции лишали корма, оставляя свободным доступ к воде. У мышей, анестезированных углекислым газом, кровь брали из ретроорбитального синуса. Шприц с иглой 27 – 30 размера вводили в венозное сплетение, расположенное в конъюнктиве внутреннего угла глаза, и забирали 100 мкл крови. У морских свинок взятие крови проводили из ушной вены в месте разветвления сосудов без анестезии. Объем забираемого образца составлял 200 мкл.

Для подсчета форменных элементов крови образцы помещали в микропробирки с антикоагулянтом K<sub>2</sub>-ЭДТА (Labor Diagnostik Systeme, Германия) и анализировали на автоматическом гематологическом анализаторе PCE90Vet (High Technology, США).

Сыворотку крови получали, как в [7], и хранили при температуре минус 20 °С.

Определение титра антител в сыворотках крови. Определение титра антител проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) согласно руководству [8]. Ультразвуковой дезинтегратор (УЗД) суспензии бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ (концентрация 5 × 10<sup>8</sup> КОЕ/мл) адсорбировали в 96-луночных полистирольных планшетах средней сорбции фирмы Greiner Bio-One (Германия) в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6 в течение ночи при температуре 4 °С. Свободные центры связывания инактивировали раствором 3% обезжиренного молока (Fluka, Швейцария) в течение 30 мин при температуре 37 °С. Сыворотки исходно разводили в 50 раз, титровали с шагом 1:2 в лунках подготовленных планшетов и инкубировали в

течение 1 ч при температуре 37 °С. После инкубации сыворотки из лунок удаляли и лунки трехкратно отмывали фосфатно-солевым буфером: 0,02 М фосфатного буфера, 0,15 М натрия хлористого с добавлением 0,05% Tween-20, pH 7,4 (ФСБ-Т). Затем в них вносили раствор конъюгата козьих антимышиных поливалентных антител к иммуноглобулинам мыши (IgG, IgA, IgM), меченных пероксидазой хрена (Sigma, США), в рабочем разведении 1:10000 или конъюгат кроличьих антител к иммуноглобулинам морских свинок (IgG), меченных пероксидазой хрена (Sigma, США), в рабочем разведении 1:20000 и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С. Разведение антител проводили в буфере ФСБ-Т. После трехкратной отмывки лунок раствором ФСБ-Т проводили ферментативную реакцию в течение 20 мин в темноте с использованием в качестве хромогена о-фенилендиамина (4 мг/мл). Реакцию останавливали внесением 0,1 мл 0,1 М соляной кислоты. Оптическую плотность (ОП) в лунках измеряли на спектрофотометре «Униплан» (Пикон, Россия) при длине волны 492 нм. За титр антител принимали максимальное разведение сыворотки, в которой ОП хромогена превышало двойное значение фоновой оптической плотности.

#### **Выделение и активация спленоцитов мышей.**

Для выделения спленоцитов мышей эвтаназировали ингаляцией CO<sub>2</sub>, стерильно вскрывали брюшную полость и забирали селезенки.

Селезенки стерильно гомогенизировали через капроновый фильтр в 5 мл среды RPMI-1640 (PAA Laboratories GE, Австрия). Полученные суспензии осаждали центрифугированием при 250 g по 10 мин. Спленоциты дважды отмывали в 7 мл среды RPMI-1640 и ресуспендировали в полной питательной среде на основе RPMI-1640 (10% фетальной сыворотки, 2 мМ глутамин, 5 мМ меркаптоэтанол, 20 мкМ Нерес) до конечной концентрации 5x10<sup>6</sup> клеток/мл. Культивирование проводили в плоскодонных 96-луночных планшетах для культуры клеток фирмы Greiner Bio-One. Для специфической активации спленоцитов к клеточной суспензии добавляли УЗД *F. tularensis* 15 (концентрация 1x10<sup>8</sup> м.к./мл). Для неспецифической активации спленоцитов применяли конканавалин А (Sigma) в концентрации 5 мкг/мл. Спленоциты культивировали при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности в течение 72 ч. После инкубации из лунок отбирали надосадочные жидкости.

**Определение концентрации гамма-интерферона.** Уровень гамма-интерферона в сыворотке крови мышей и количество гамма-интерферона, секретируемого активированными спленоцитами, определяли методом ИФА, используя наборы фирмы eBioScience (Австрия) согласно инструкции.

Определение вирулентности штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1 recA на лабораторных животных. Мышам линии BALB/c и морским свинкам вводили подкожно по 0,2 и 0,5 мл соответственно суспензии бактерий

*F. tularensis* в диапазоне доз 1x10<sup>4</sup> – 1x10<sup>7</sup> КОЕ (мышам) и 1x10<sup>7</sup> – 1x10<sup>9</sup> КОЕ (морским свинкам). Наблюдение за животными проводили в течение 21 дня.

**Гистологические исследования.** Гистологические срезы тканей легких, печени, селезенки и паховых лимфатических узлов морских свинок готовили из фиксированного в 10% формалине материала по общепринятой методике [9], и окрашивали гематоксилин-эозином. Микроскопирование препаратов проводили на световом микроскопе Nikon Eclipse 80i (Япония) при использовании объектива с четырехкратным увеличением. Изображения срезов документировали с помощью камеры Nikon DS-Ri1 (Япония).

**Определение протективной активности штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1 recA на лабораторных животных.** Иммунизированным лабораторным животным подкожно вводили 5x10<sup>3</sup> КОЕ (1000 Dcl) тест-заражающего штамма *F. tularensis* 503. Наблюдение за животными вели в течение 21-х суток.

**Статистические методы.** Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel.

Величины LD<sub>50</sub> определяли по методу Г. Кербера (G. Kerber) в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [10]. Достоверность отличий определяли по *t*-критерию Стьюдента (*p* < 0,05) с помощью пакета статистических программ Windows Excel.

#### **Результаты и обсуждение**

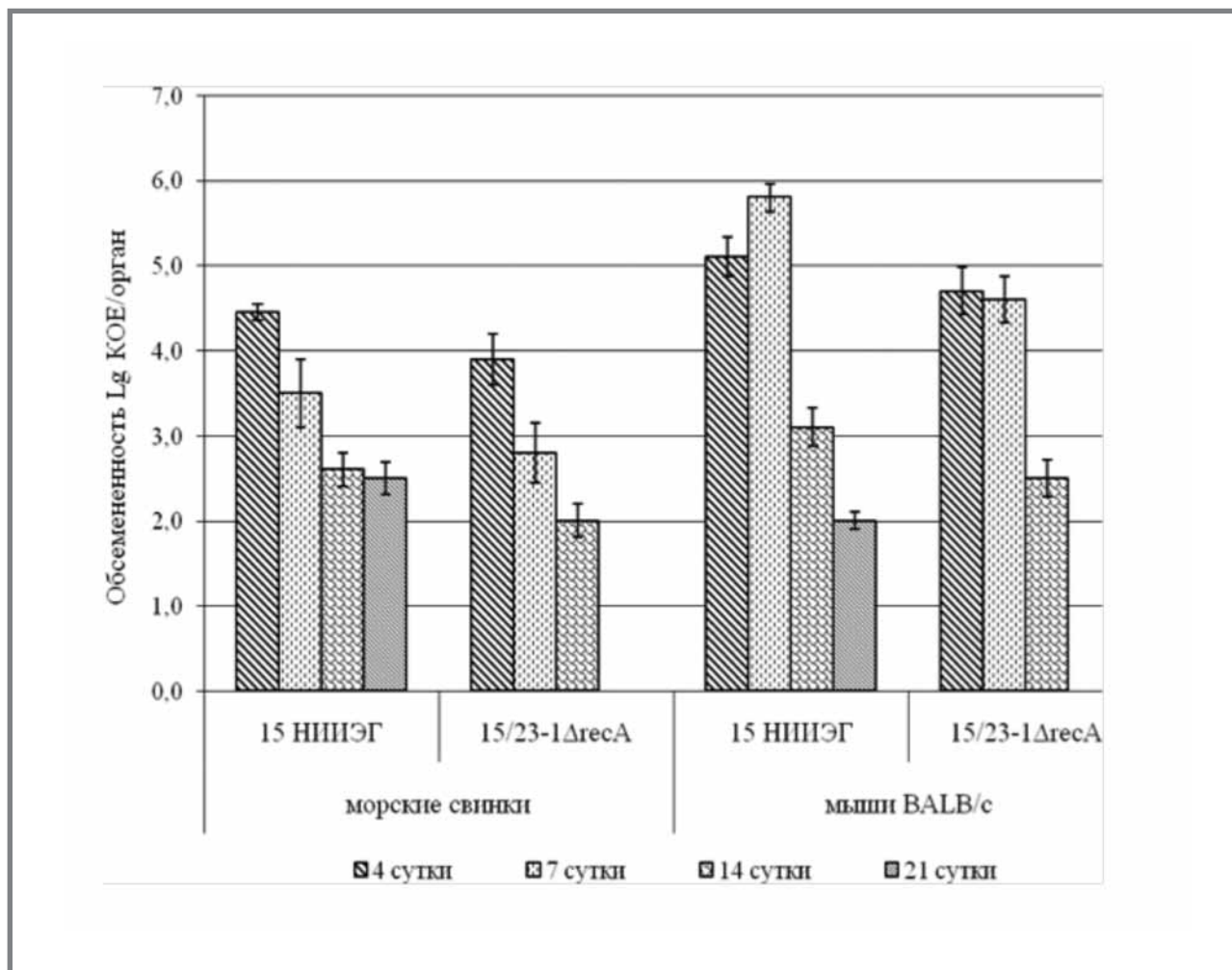
**Определение количества бактерий *F. tularensis* и длительности их персистенции в селезенках мышей и морских свинок.** Группы мышей линии BALB/c и морских свинок были проиммунизированы штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA и в качестве контроля штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

По мере развития иммунного процесса из экспериментальных групп забирали по три особи, в селезенках которых определяли количество живых клеток туляремийного микроба (рис. 1).

После подкожного введения бактерии *F. tularensis* от места инокуляции переносятся в паренхиматозные органы (печень и селезенку), где начинается их интенсивное размножение. У морских свинок максимальную обсемененность селезенки наблюдали на 4-е сутки в обеих группах без достоверных отличий. С 7-х по 14-е сутки в обеих группах происходило постепенное снижение обсемененности. В группах, в которых использовался штамм 15 НИИЭГ, достоверных отличий в обсемененности селезенки на 14-е и 21-е сутки не было выявлено. Особенностью штамма 15/23-1 recA стало то, что его не обнаруживали в селезенках морских свинок на 21-е сутки после иммунизации.

В случае мышей максимальную обсемененность селезенки фиксировали на 7-е сутки (штамм 15 НИИЭГ) и на 4 – 7-е сутки (штамм 15/23-1 recA). На 14-е сутки обсемененность снижалась в 400 раз в группе мышей, иммунизированных штаммом

**Рисунок 1.**  
Изменение обсемененности селезенок морских свинок и мышей линии BALB/c после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15/23-1 recA и 15 НИИЭГ



*F. tularensis* 15 НИИЭГ, и в 100 раз – штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA. Бактерии туляремии штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ продолжали персистировать в организме мышей более 21-х суток, однако их количество снижалось к 21-м суткам на порядок по сравнению с их содержанием на 14-е сутки в отличие от морских свинок. В случае штамма *F. tularensis* 15/23-1 recA живых бактерий в селезенках на 21-е сутки обнаружено не было (т.е. количество бактерий меньше 25 КОЕ в селезенке).

Изменение веса животных в процессе иммунизации штаммами *F. tularensis* 15/23-1 recA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Размножение туляреминого микроба в органах животных активирует иммунную систему, а через нее влияет на метаболизм организма, что, в частности, приводит к изменению количества потребляемой воды и пищи и, соответственно, изменению веса. Динамика веса морских свинок и мышей в течение 21-х суток после иммунизации приведена на рисунке 2.

На рисунке 2 видно, что введение бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ угнетает метаболизм морских свинок, что приводит к существенному снижению веса (более 20%) к 5-м суткам после им-

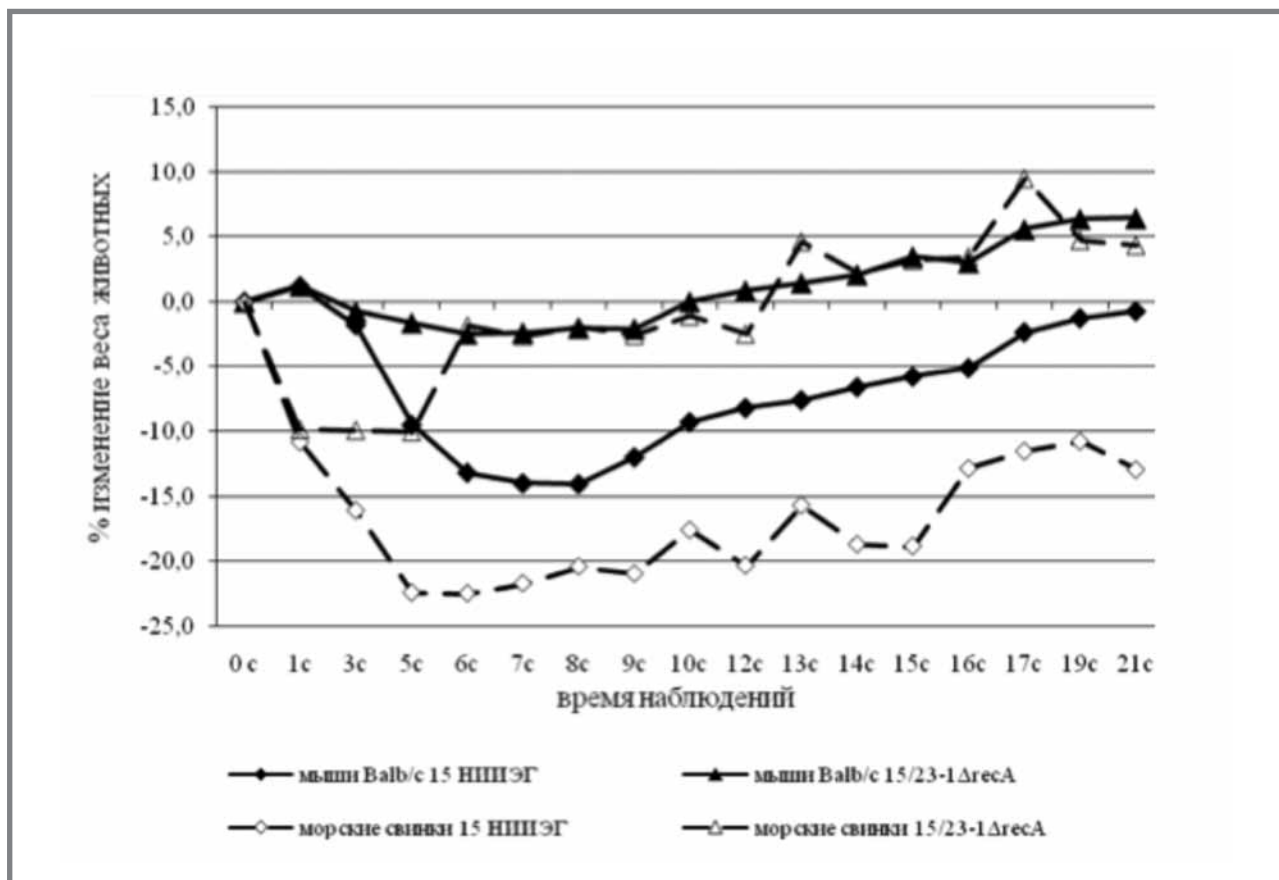
мунизации. При введении штамма *F. tularensis* 15/23-1 recA снижение веса в этот период было менее выраженным (10%). Затем вес животных увеличивался и достигал исходных величин к 13 суткам для группы, иммунизированной штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA, и далее продолжал увеличиваться. В случае штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ наблюдали только незначительное прибавление веса, и на 21-е сутки он продолжал оставаться существенно меньше исходного веса животных. Сходную картину наблюдали и для иммунизированных мышей, однако на 21-е сутки вес животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, приблизился к исходному. Более медленная кинетика прибавления веса у морских свинок и мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, коррелировала с обсемененностью селезенок туляреминым микробом до 21-е сутки (рис. 1).

**Гематологические показатели животных, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15/23-1 recA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ.** Определенные количества эритроцитов и гемоглобина, лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов и тромбоцитов у морских свинок и мышей проводили через



**Рисунок 2.**

**Изменение веса морских свинок и мышей линии BALB/c после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15/23-1 recA и 15 НИИЭГ по отношению к первому дню**



4, 7, 15 и 21 сутки после иммунизации. Для сравнения эти показатели определяли также и перед иммунизацией животных.

Введение исследуемых штаммов туляремийного микроба не изменяло концентрацию эритроцитов и уровень гемоглобина в крови: у морских свинок гемоглобин находился в диапазоне концентраций 149 – 167 г/л, количество эритроцитов составляло 5,84 – 6,61x10<sup>12</sup>/л, у мышей концентрация гемоглобина колебалась в пределах 102 – 128 г/л, а количество эритроцитов – 7,37 – 9,42x10<sup>12</sup>/л.

Существенные отличия в количестве форменных элементов крови животных, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15/23-1 recA15 и *F. tularensis* НИИЭГ, были выявлены только для лейкоцитов и тромбоцитов (табл. 1).

К 4 суткам после иммунизации исследуемыми штаммами у морских свинок наблюдали лейкопению (см. табл. 1). Для группы, иммунизированной штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, лейкопения переходит на 14 – 21-е сутки в незначительный лейкоцитоз, что, возможно, указывает на наличие воспалительного процесса в организме животных. Подобный лейкоцитоз не наблюдали у морских свинок, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA, что коррелирует с отсутствием обсемененности и восстановлением веса на 21-е сутки (рис. 1 и 2). Закономерность, наблюдаемую для морских свинок, обработанных штам-

мом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, отмечали и для группы мышей, иммунизированных тем же штаммом. У мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA, лейкопении в течение 4 – 7-ми суток не наблюдали, и только на 14-е сутки фиксировали относительный лейкоцитоз, что указывает на незначительный уровень воспалительного процесса в организме мышей.

У морских свинок к 4-м суткам после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/23-1 recA развилась выраженная тромбоцитопения (см. табл. 1). В случае иммунизации штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA нормальный уровень тромбоцитов восстановился к 7-м суткам, у животных, которым вводили штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, уровень тромбоцитов достиг нормы только к 21-м суткам. У мышей линии BALB/c при иммунизации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ транзиторную тромбоцитопению наблюдали только на 7-е сутки, а с 14 по 21-е сутки фиксировали картину с выраженным тромбоцитозом. Штамм *F. tularensis* 15/23-1 recA достоверно не вызывал тромбоцитопении и тромбоцитоза.

Определение концентрации гамма-интерферона в крови. В сыворотках крови, полученных от мышей линии BALB/c с 0 по 14-е сутки после иммунизации, определяли концентрацию гамма-интерферона (табл. 2). Наибольший уровень интерферона в сыворотках крови наблюдали на 7-е сутки,

Таблица 1.

Изменение количества лейкоцитов и тромбоцитов в крови морских свинок и мышей линии BALB/c после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15/23-1 recA и 15 НИИЭГ

Форменные элементы	Лабораторные животные	Штаммы	Время после иммунизации и концентрация клеток 109/мл				
			0-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Лейкоциты	морские свинки	15	6,0 ± 1,5	1,7 ± 0,5	3,9 ± 1,1	9,3 ± 0,4	8,6 ± 2,5
		15/23-1 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	4,6 ± 0,7	2,5 ± 0,4	2,6 ± 0,5	8,2 ± 0,9	6,8 ± 0,9
		15/23-1 recA	4,6 ± 0,7	5,3 ± 0,4	4,1 ± 0,3	7,8 ± 1,0	6,0 ± 0,6
Тромбоциты	морские свинки	15	600 ± 140	70 ± 25	120 ± 30	270 ± 30	520 ± 213
		15/23-1 recA	430 ± 70	160 ± 54	520 ± 183	440 ± 70	380 ± 110
	мыши BALB/c	15	560 ± 35	390 ± 83	240 ± 59	900 ± 174	790 ± 72
		15/23-1 recA	560 ± 35	620 ± 130	460 ± 47	840 ± 322	700 ± 112

Таблица 2.

Концентрация гамма-интерферона в сыворотках иммунизированных мышей линии BALB/c

Штамм <i>F. tularensis</i>	Время и концентрация гамма-интерферона (пкг/мл)			
	0-е	4-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
15 НИИЭГ	94 ± 13	380 ± 40	1700 ± 190	72 ± 12
15/23-1 recA	94 ± 13	270 ± 24	330 ± 40	80 ± 14

а на 14 сутки он снижался до первоначального уровня. Штамм *F. tularensis* 15/23-1 recA в процессе размножения и персистенции индуцировал в крови в 5 раз меньше интерферона, чем штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

**Определение вирулентности штаммов *F. tularensis* 15/23-1 recA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ для морских свинок и мышей линии BALB/c.** Известно, что вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ умеренно вирулентен для мышей и практически авирулентен для морских свинок [1]. Для выяснения влияния deletированных генов *iglC* и *recA* в штамме *F. tularensis* 15/23-1 recA на его остаточ-

ную вирулентность были инфицированы разными дозами 7 групп мышей (табл. 3).

Для сравнения был использован штамм 15 НИИЭГ (табл. 4).

Для изучения влияния инактивации генов *iglC* и *recA* в штамме *F. tularensis* 15/23-1 recA на его остаточную вирулентность для морских свинок были инфицированы 3 группы животных (табл. 5).

Для сравнения был использован штамм 15 НИИЭГ (табл. 6).

Полученные данные свидетельствуют, что остаточная вирулентность модифицированного штамма для мышей линии BALB/c стала ниже более чем

Таблица 3.

Выживаемость мышей линии BALB/c после введения бактерий *F. tularensis* 15/23-1 recA

Доза, КОЕ	Количество выживших*	% выживших	Средняя продолжительность жизни, сутки
1,6 × 10 <sup>1</sup>	10	100	>21,0
1,6 × 10 <sup>2</sup>	10	100	>21,0
1,6 × 10 <sup>3</sup>	9	90	8,0
1,6 × 10 <sup>4</sup>	7	70	6,3
1,6 × 10 <sup>5</sup>	1	10	6,4
1,6 × 10 <sup>6</sup>	0	0	5,4
1,6 × 10 <sup>7</sup>	0	0	3,9

Примечание: \*По 10 мышей в группе.

**Таблица 4.**

**Выживаемость мышей линии BALB/c после введения бактерий *F. tularensis* 15НИИЭГ**

Доза, КОЕ	Количество выживших*	% выживших	Средняя продолжительность жизни, сутки
1,0x10 <sup>1</sup>	5	100	>21,0
1,0x10 <sup>2</sup>	2	40	9,3
1,0x10 <sup>3</sup>	0	0	8,6

Примечание: \*по 5 мышей в группе.

**Таблица 5.**

**Выживаемость морских свинок после введения бактерий *F. tularensis* 15/23-1 recA**

Доза, КОЕ	Количество выживших*	% выживших
1,0x10 <sup>7</sup>	5	100
1,0 x10 <sup>8</sup>	5	100
1,0x10 <sup>9</sup>	5	100

Примечание: \*По 5 морских свинок в группе.

**Таблица 6.**

**Выживаемость морских свинок после введения бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ**

Доза, КОЕ	Количество выживших*	% выживших	Средняя продолжительность жизни, сутки
1,0x10 <sup>7</sup>	5	100	>21,0
1,0x10 <sup>8</sup>	5	100	>21,0
1,0x10 <sup>9</sup>	3	60	15,0

Примечание: \*По 5 морских свинок в группе.

на два порядка ( $LD_{50} = 2,5 \times 10^4$  КОЕ) по сравнению со штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ ( $LD_{50} = 7,9 \times 10^1$  КОЕ). Такое снижение вирулентности указывает на меньшее патологическое воздействие штамма на организм, вероятно связанное с существенно меньшей обсемененностью (практически в 10 раз через 7 суток после заражения). Для морских свинок оба штамма практически авирулентны, хотя для штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ наблюдали только 60% выживаемость при введении  $1,0 \times 10^9$  КОЕ (см. табл. 6).

**Гистологические исследования.** Для выявления патологических изменений в органах иммунизированных морских свинок штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA были проведены гистологические исследования срезов тканей легких, печени, селезенки и паховых лимфоузлов, полученные через 28 суток после иммунизации дозами от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{10}$  КОЕ. Структуру этих срезов сравнивали со срезами органов животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ дозами  $5 \times 10^5$  -  $5 \times 10^9$  КОЕ, и неиммунизированных.

Легкие у морских свинок, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA, в основном имели нормальную структуру. В отдельных случаях при всех дозах иммунизации в гистологических срезах встречались участки с утолщенными межальвеолярными перегородками, инфильтри-

рованные мононуклеарными клетками. Сходную картину наблюдали и для животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ (рис. 3).

В гистологических срезах ткани печени у морских свинок, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15/23-1 recA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, отклонений в структуре тканей от нормы не выявили при всех дозах иммунизации (рис. 4).

В селезенках морских свинок, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA при дозах  $1 \times 10^8$  КОЕ и  $1 \times 10^{10}$  КОЕ, отмечали выраженную гиперплазию белой пульпы. Лимфатические фолликулы были увеличены и имели широкие мантийные зоны, иногда сливающиеся у нескольких фолликулов, с крупными центрами размножения. В красной пульпе наблюдали большое количество лимфоцитов (рис. 5). При иммунизации дозой  $1 \times 10^6$  КОЕ лимфатические фолликулы имели несколько меньшие размеры, с небольшими центрами размножения (данные не приведены).

У морских свинок, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, лимфатические фолликулы в селезенках имели также крупные размеры, но без выраженных центров размножения. Количество лимфоцитов в красной пульпе было увеличено по сравнению с неиммунизированными животными (см. рис. 5). Подобная картина наблюдалась на всех дозах иммунизации вакцинным штаммом.

Рисунок 3.

Срезы ткани легких морских свинок, иммунизированных: А - штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе  $5 \times 10^9$  КОЕ, Б - штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA в дозе  $1 \times 10^8$  КОЕ

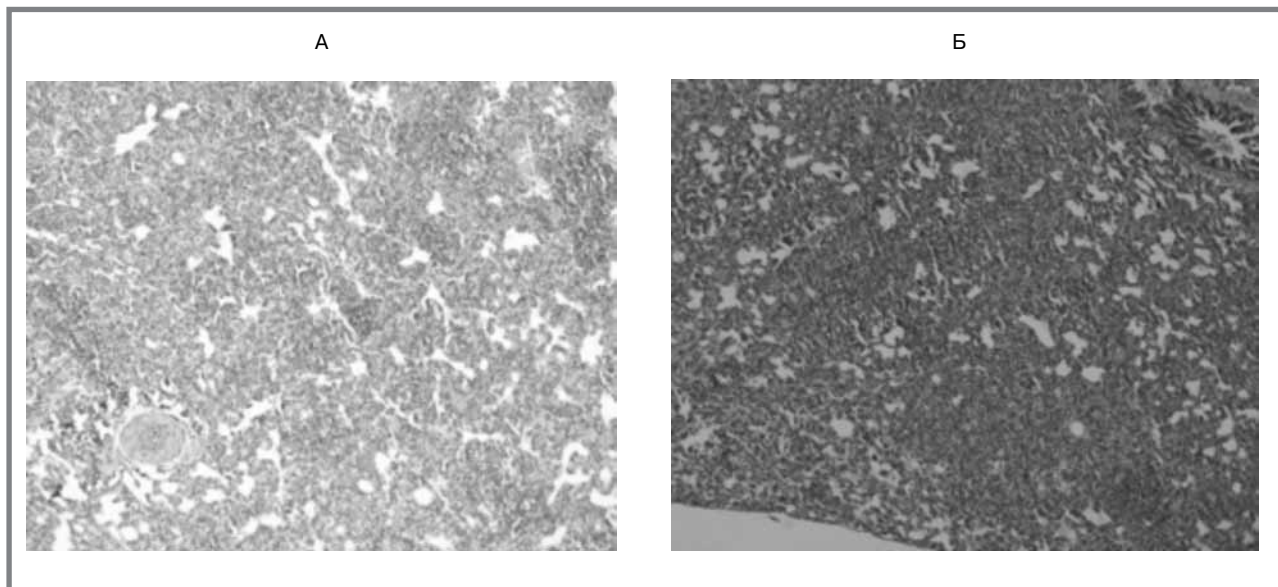
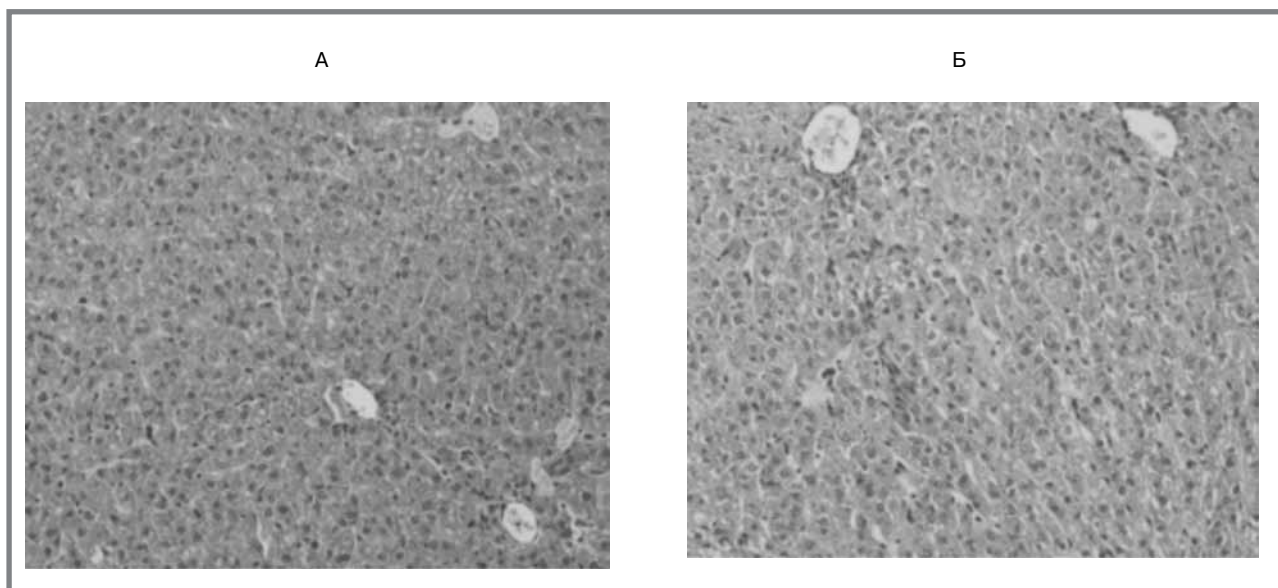


Рисунок 4.

Срезы ткани печени морских свинок, иммунизированных: А – штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе  $5 \times 10^9$  КОЕ, Б - штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA в дозе  $1 \times 10^8$  КОЕ



В регионарных лимфатических узлах у морских свинок, иммунизированных как штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA, так и вакцинным штаммом, во всех зонах лимфатических узлов наблюдали повышенное количество лимфоцитов, а также лимфатических фолликулов, размеры которых были увеличены по сравнению с контролем. Более выраженная картина была у животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA (рис. 6). На окрашенных срезах видны плотные скопления лимфоцитов в синусах лимфатических узлов: единичные, небольших размеров у морских свинок, иммунизированных дозой  $5 \times 10^9$  КОЕ штамма 15 НИИЭГ, и множественные, из большого количества клеток, у морских свинок, иммунизированных дозой  $1 \times 10^{10}$  КОЕ штамма 15/23-1 recA (см. рис. 6).

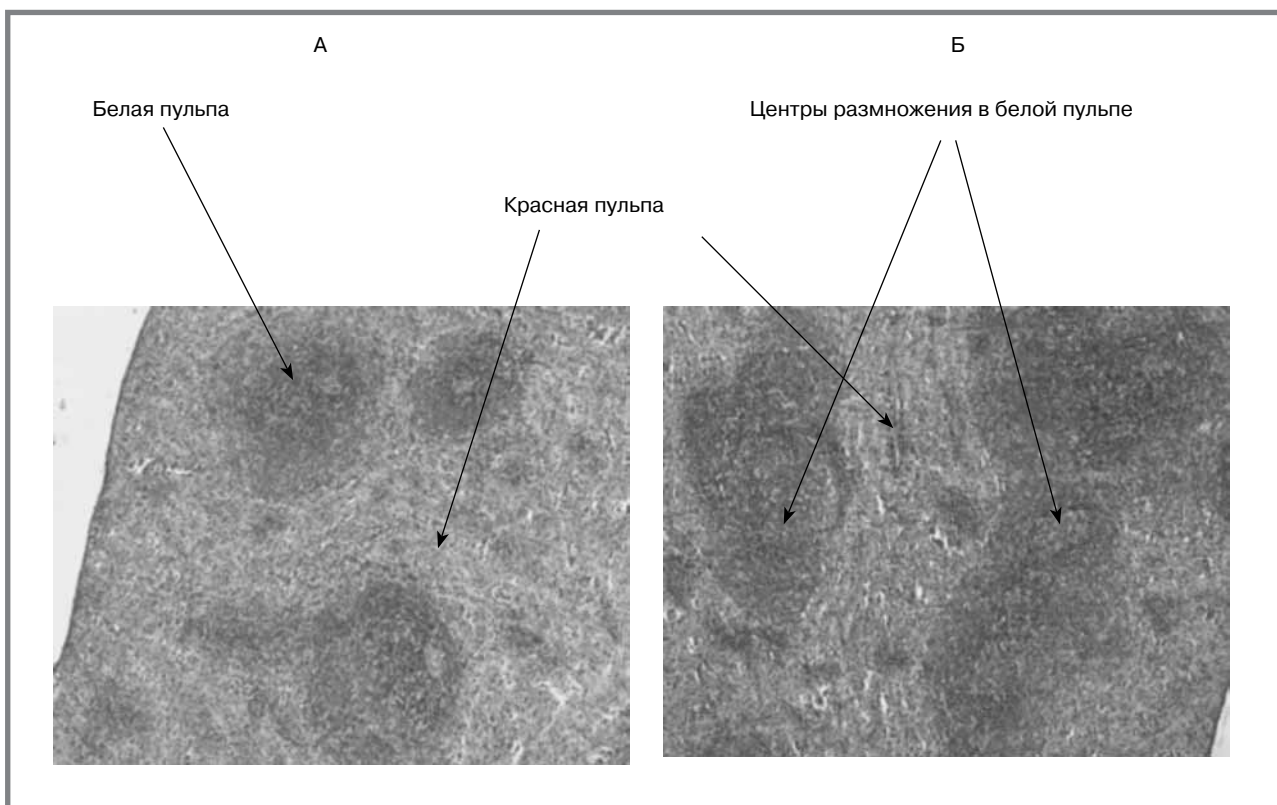
**Сравнительное изучение иммуногенных свойств штаммов *F. tularensis* 15/23-1 recA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ.** В сыворотках иммунизированных животных на 21 сутки после введения клеток туляремиального микроба определяли концентрацию антител к суммарному антигену *F. tularensis* (табл. 7).

Достоверных отличий в титрах специфических антител, индуцированных иммунизацией штаммами *F. tularensis* 15/23-1 recA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ на 21-е сутки, не было выявлено. Титры антител к суммарному антигену туляремиального микроба у морских свинок были существенно выше, чем у мышей линии BALB/c. Данный факт характерен для обоих штаммов. Более высокие титры антител у морских свинок обусловлены, вероятно, высокой дозой иммунизации ( $1 \times 10^8$  КОЕ).



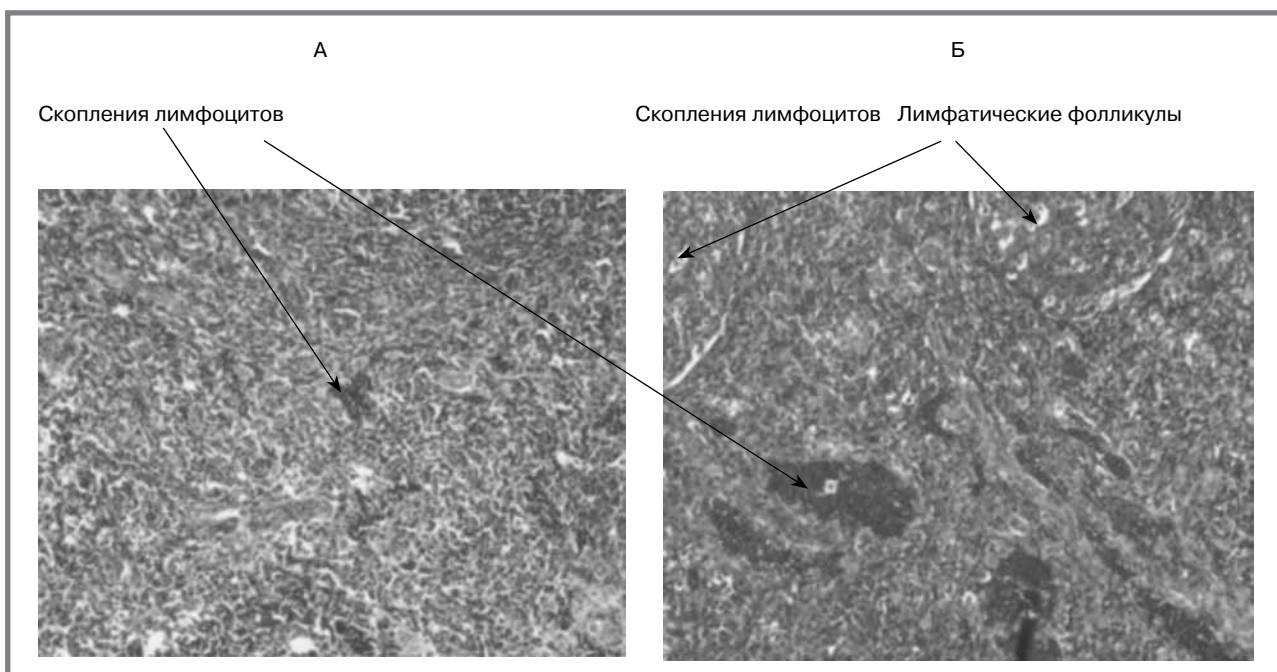
**Рисунок 5.**

Срезы ткани селезенки морских свинок, иммунизированных: А – штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе  $5 \times 10^9$  КОЕ, Б – штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA в дозе  $1 \times 10^{10}$  КОЕ



**Рисунок 6.**

Срезы ткани паховых лимфатических узлов морских свинок, иммунизированных: А – штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе  $5 \times 10^9$  КОЕ, Б – штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA в дозе  $1 \times 10^{10}$  КОЕ



Уровни синтеза гамма-интерферона спленоцитами при стимуляции туляремийным антигеном были определены у групп мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15/23-1 recA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, через 30 суток (рис. 7).

У иммунизированных мышей продукция гамма-интерферона активированными спленоцитами

достоверно превышала синтез интерферона неактивированными спленоцитами. Однако статистически достоверных отличий между группами мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15/23-1 recA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, по способности синтезировать гамма-интерферон спленоцитами не было выявлено.

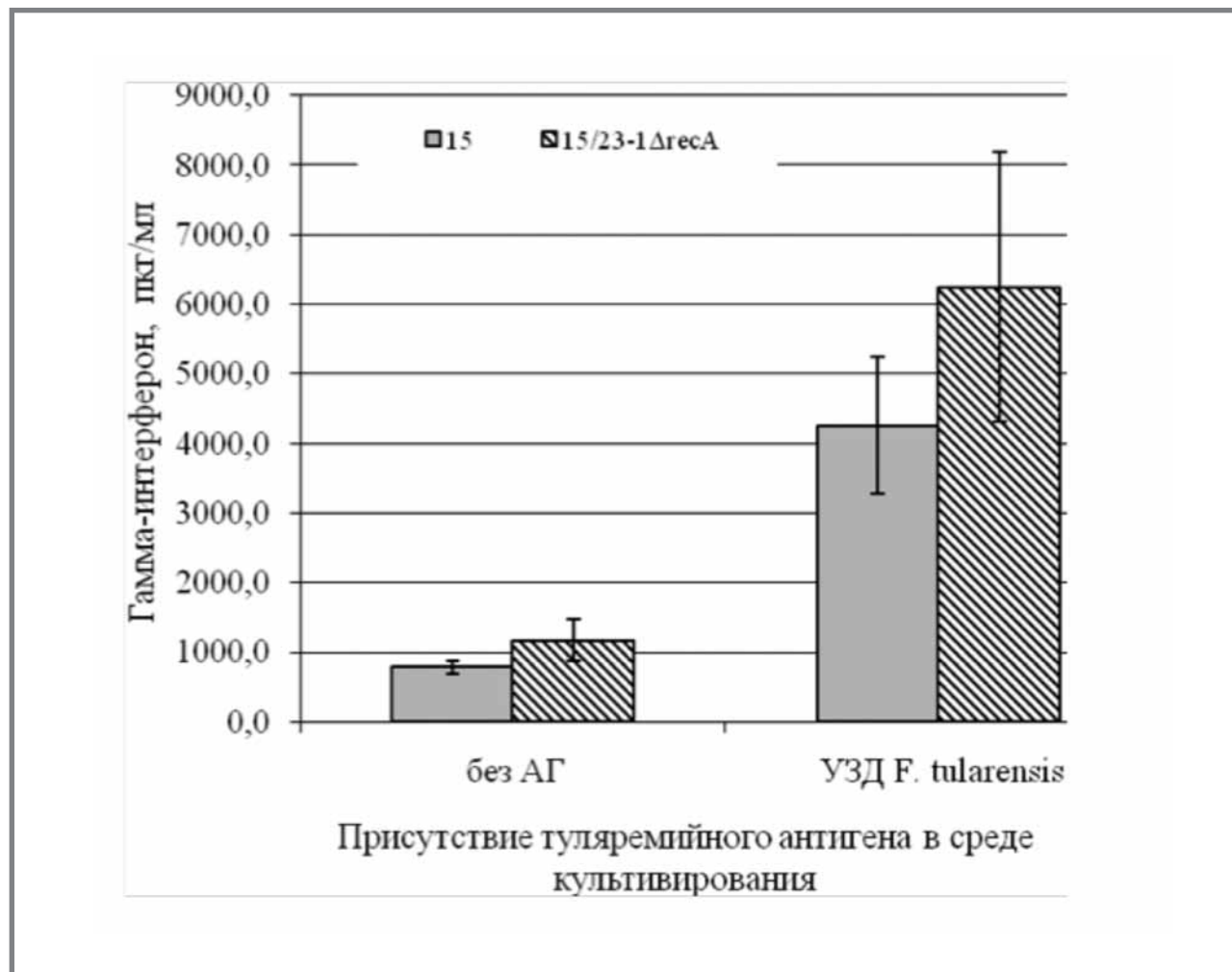
Таблица 7.

Титры антител к туляремийным антигенам у морских свинок и мышей на 21 сутки после иммунизации

Штаммы	Лабораторные животные и титры антител	
	морские свинки	мыши линии BALB/с
<i>F. tularensis</i> 15/23-1 recA	1/10000 (1/800 – 1/25600)	1/400 (1/400 – 1/1600)
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	1/5000 (1/1600 – 1/12800)	1/400 (1/400 – 1/1600)

Рисунок 7.

Индукцированный синтез гамма-интерферона спленоцитами мышей, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15/23-1 recA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ



Протективную активность изучаемых штаммов определяли на мышах линии BALB/с в различные сроки после иммунизации (табл. 8). В качестве тест-заражающего штамма использовали штамм *F. tularensis* 503, обладающий безусловно смертельной дозой (Dcl) для мышей и морских свинок в дозе менее 5 КОЕ.

Для морских свинок протективность изучаемых штаммов определяли на 30-е сутки после подкожной иммунизации (табл. 9).

Данные, приведенные в таблицах 8 и 9, свидетельствуют, что протективная активность штамма *F. tularensis* 15/23-1 recA не отличается от активности вакцинного штамма как в отношении морских свинок, так и мышей линии BALB/с.

В данной работе были изучены иммунобиологические свойства штамма *F. tularensis* 15/23-1 recA на мышах линии BALB/с и морских свинок. Этот штамм отличается от вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ отсутствием в хромосоме одной из двух копий гена *igI*C и гена *recA*. Продукт гена *igI*C является одним из ключевых факторов вирулентности, без которого природные штаммы *F. tularensis*, а также вакцинный штамм становятся авирулентными для мышей [11, 12], а продукт гена *recA* является ключевым в системе гомологичной рекомбинации [13, 14].

Для формирования полноценного иммунитета против внутриклеточных паразитов необходимо, чтобы вакцинный штамм персистировал в макро-

**Таблица 8.**  
Протективность штаммов *F. tularensis* 15/23-1 recA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ при подкожной иммунизации мышей линии BALB/c против подкожного заражения штаммом *F. tularensis* 503

Сутки после иммунизации	Штамм	Иммунизирующая доза, КОЕ	Заражающая доза, КОЕ*	% выживших	Средняя продолжительность жизни, сутки
–	–	0	5,0 × 10 <sup>1</sup>	0	5,4
30	15	4,0 × 10 <sup>0</sup>	5,0 × 10 <sup>3</sup>	100	> 21,0
	15/23-1 recA	1,0 × 10 <sup>1</sup>		100	> 21,0
60	15	4,0 × 10 <sup>0</sup>		100	> 21,0
	15/23-1 recA	1,0 × 10 <sup>1</sup>		100	> 21,0
90	15	4,0 × 10 <sup>0</sup>		100	> 21,0
	15/23-1 recA	1,0 × 10 <sup>1</sup>		100	> 21,0
180	15	4,0 × 10 <sup>0</sup>		100	> 21,0
	15/23-1 recA	1,0 × 10 <sup>1</sup>		100	> 21,0

Примечание: \*По 5 мышей в группе

**Таблица 9.**  
Протективность штаммов *F. tularensis* 15/23-1 recA и *F. tularensis* 15 НИИЭГ при подкожной иммунизации морских свинок против подкожного заражения штаммом *F. tularensis* 503

Штамм <i>F. tularensis</i>	Иммунизирующая доза, КОЕ	Заражающая доза, КОЕ*	% выживших	Средняя продолжительность жизни, сутки
–	–	5,0 × 10 <sup>1</sup>	0	9,3
15	2,0 × 10 <sup>2</sup>	5,0 × 10 <sup>3</sup>	80	16,0
15/23-1 recA			80	17,0
15	2,0 × 10 <sup>3</sup>		100	> 21,0
15/23-1 recA			100	> 21,0
15	2,0 × 10 <sup>4</sup>		100	> 21,0
15/23-1 recA			100	> 21,0
15	2,0 × 10 <sup>5</sup>		100	> 21,0
15/23-1 recA			100	> 21,0
15	2,0 × 10 <sup>6</sup>		100	> 21,0
15/23-1 recA			100	> 21,0
15	2,0 × 10 <sup>7</sup>		100	> 21,0
15/23-1 recA			100	> 21,0
15	2,0 × 10 <sup>8</sup>		100	> 21,0
15/23-1 recA			100	> 21,0

Примечание: \*По 5 морских свинок в группе.

организме более 10 дней. Это время необходимо для формирования как гуморального, так и клеточного иммунитета [15]. В данной работе мы показали, что штамм *F. tularensis* 15/23-1 recA обнаруживается в селезенке до 14 сут после иммунизации, а на 21-е сутки организм становится практически стерильным. При иммунизации мышей вакцинным

штаммом живые бактерии обнаруживаются в селезенке и на 21-е сутки, что, вероятно, указывает на важность копийности гена *igI*C для выживания возбудителя туляремии в организме. Вероятно, в этом случае бактериальные клетки находятся в структурах селезенки, недоступных для иммунной системы. Данное явление наблюдали при исследо-

вании выживших мелких грызунов, инфицированных природными штаммами туляремиального микроба [18], модифицированный штамм не обладает такой способностью, что является положительным свойством при использовании его для вакцинации людей с ослабленным иммунитетом.

### Выводы

1. Штамм *F. tularensis* 15/23-1 recA, в отличие от вакцинного штамма 15 НИИЭГ, практически не вызывает уменьшения веса у иммунизированных животных, что, вероятно, указывает на его меньшую реактогенность.
2. Модифицированный вакцинный штамм *F. tularensis* 15/23-1 recA имеет преимущества по гематологическим показателям перед штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Наблюдаемые лейкопения и тромбоцитопения в первую неделю после иммунизации менее выражены, хотя на 14 – 21-е сутки лейкопения переходит в лейкоцитоз у животных, иммунизированных обоими штаммами. Полученные данные позволяют высказать предположение о возможности использования информации о количестве лейкоцитов и тромбоцитов как индикатора реактогенности вакцинных штаммов.
3. На меньшую воспалительную реакцию в организме мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/23-1 recA, указывает и тот факт, что уровень гамма-интерферона в их крови на 7-е сутки в 5 раз меньше, чем в организме мышей, иммунизированных вакцинным штаммом. По мере развития иммунного процесса уровень гамма-интерферона на 14-е сутки существенно снижается и сравнивается для обоих штаммов.
4. Сниженная способность к размножению в организме мышей штамма *F. tularensis* 15/23-1 recA коррелирует с уменьшением его вирулентно-

сти более чем на два порядка по сравнению со штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

5. Данные гистологических исследований селезенки и лимфатических узлов морских свинок указывают на то, что штамм 15/23-1 recA стимулирует морфологически более выраженную перестройку во внутренних органах по сравнению со штаммом 15 НИИЭГ, не проявляя при этом токсического действия.
6. Модификация вакцинного штамма не влияет на уровень антитуляремиальных антител в сыворотках иммунизированных мышей линии BALB/c и морских свинок, а также на уровень гамма-интерферона, секретируемого спленоцитами мышей, активированными туляремиальным антигеном.

Таким образом, снижение копийности гена *igIC* с двух до одной копии и удаление гена *recA* не влияет на индукцию гуморального и клеточного иммунитета у экспериментальных животных и не меняет их способность выживать после подкожного заражения вирулентным штаммом туляремиального микроба. Иммунитет, созданный изучаемыми штаммами, сохраняется у мышей по меньшей мере в течение 180 суток. Однако остается открытым вопрос о способности иммунизированных этими штаммами животных противостоять интраназальному и аэрозольному заражению высоковирулентными штаммами *F. tularensis* subsp. *tularensis*, так как известно, что штамм LVS, являющийся селекционным вариантом штамма 15, практически не защищает иммунизированных внутривенно мышей от аэрозольного заражения штаммом Schu (subsp. *tularensis*) [16, 17]. В последующих работах предполагается провести расширенные исследования протективных свойств полученного штамма с использованием интраназального заражения животных высоковирулентными штаммами.

### Литература

1. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. Москва: Медицина; 1975: 192.
2. Медуницын Н.В. Вакцинология. Москва: «Триада-Х»; 1999: 272.
3. Основные требования к вакцинным штаммам туляремиального микроба: Методические указания. МУ 3.3.1.2161-07. Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007: 51.
4. Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Комбарова Т.И. и др. Получение и иммунобиологические свойства вакцинного штамма туляремиального микроба без одной копии гена *igIC* и без гена *recA*. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 2015; 3: 33 – 39.
5. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 года № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации».
6. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Санкт-Петербург: 48.
7. Комбарова Т.И., Павлов В.М., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Борзилов А.И. и др. Сравнительная оценка реактогенности туляремиальной вакцины на различных биомоделях. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2013; 71 (4): 54 – 62.
8. Ed. by Ngo T.T., Lenhoff H.M. Enzyme-mediated immunoassay. Plenum Press, New York and London. 1988: 444.
9. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. Санкт-Петербург; 2010: 95
10. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Гос. изд-во. мед. лит.; 1962: 180..
11. Mokrievich A.N., Mironova R.I., Vachrameeva G.M., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Pavlov V.M. Development and properties of *igIC*-mutants of *Francisella tularensis* strains 15/10 and 503. 5th International Conference on Tularemia, Marine Biological Labs, Woods Hole, MA, USA; 2006. 246C.
12. Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Бахтеева И.В., Титарева Г.М. и др. Создание и изучение вариантов вакцинного штамма *Francisella tularensis* без генов *igIC*. Сообщение 2. Проблемы особо опасных инфекций. 2013; 118 (4): 102 – 105.
13. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. Москва: Наука; 1984: 472.
14. Лапин А.А., Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Комбарова Т.И., Бахтеева И.В., Дятлов И.А. и др. Иммунобиологические свойства штамма *Francisella tularensis* 15/10 с делегированным геном *recA*. Проблемы особо опасных инфекций. 2011; 110 (4): 65 – 67.
15. Cowley S.C., Elkins K.L. Immunity to *Francisella*. Frontiers In Microbiology. 2011; 2 (26): 1 – 21.



16. Ellis J., Oyston P.S.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15(4): 631 – 646.
17. Conlan W.J., Shen H., Kuolee R., Zhao X., Chen W. Aerosol-, but not intradermal-immunization with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* protects mice against subsequent aerosol challenge with a highly virulent type A strain of the pathogen by an alpha-beta T cell- and interferon gamma- dependent mechanism. *Vaccine*. 2005; 23 (19): 2477 – 2485.
18. Пилипенко В.Г., Щекина Т.А., Басилова Г.И. О длительном бактерионосительстве при туляремии у высокочувствительных лабораторных и диких грызунов и возможности перехода латентной инфекции в острый инфекционный процесс. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1983; 8:108 – 109.

## References

1. Olsuf'ev N.G. Taxonomy, Microbiology and Laboratory Diagnosis of the Causative Agent of Tularemia. Moscow: Medicina; 1975; 192 (in Russian).
2. Medunicyn N.V. Vaccinology. Moscow: «Triada-X»; 1999; 272 (in Russian).
3. Basic Requirements for Tularemia Microbe Vaccine Strains: Guidelines, MG. 3.3.1.2161-07. Moscow: Federal Centr of Gigieny and Epidemiology of Federal Service of Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2007; 51 (in Russian).
4. Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Mironova R.I., Kombarova T.I. et al. Construction and Characterization of *Francisella tularensis* Vaccine Strain with a Single Copy of *igIC* Gene and Lacking *recA* Gene. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2015; 30 (3): 148 – 156.
5. The order of Ministry of Healthcare of the Russian Federation of 19.06. 2003, № 267 Terms of laboratory practice in the Russian Federation (in Russian).
6. Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes. Sankt Peterburg: 48 (in Russian).
7. Kombarova T.I., Pavlov V.M., Kravchenko T.B., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Borzilov A.I. et al. Comparative Evaluation of Reactogenicity Tularemia Vaccine Using of Different Biomodels. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2013; 71 (4): 54 – 62 (in Russian).
8. Ed. by Ngo T.T., Lenhoff H.M. Enzyme-mediated immunoassay. Plenum Press, New York and London. 1988: 444.
9. Korzhhevskij D.Je., Giljarov A.V. Basics of histologic techniques. Sankt Peterburg; 2010: 95 (in Russian)/
10. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. Statistical methods in microbiological studies. Leningrad; 1962: 180 (in Russian)
11. Mokrievich A.N., Mironova R.I., Vakhrameeva G.M., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Pavlov V.M. Development and properties of *igIC*-mutants of *Francisella tularensis* strains 15/10 and 503. 5th International Conference on Tularemia, Marine Biological Labs, Woods Hole, MA, USA; 2006: 246.
12. Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Mironova R.I., Kombarova T.I., Bakhteeva I.V., Titareva G.M. et al. Construction and Investigation of the Variants of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* Lacking *igIC* Genes. Communication 2. Problems of especially dangerous infections. 2013; 118 (4): 102 – 105 (in Russian)/
13. Hesin R.B. Genome Instability. M.: Nauka; 1984. 472.
14. Lapin A.A., Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Kombarova T.I., Bakhteeva I.V., Dyatlov I.A. et al. Immunobiological Properties of *Francisella tularensis* 15/10 Strain with Deleted *recA* Gene. Problems of especially dangerous infections. 2011; 110 (4): 65 – 67 (in Russian).
15. Cowley S.C., Elkins K.L. Immunity to *Francisella*. *Frontiers In Microbiology*. 2011.; 2 ( 26): 1 – 21.
16. Ellis J., Oyston P.S.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15 (4): 631 – 646.
17. Conlan W.J., Shen H., Kuolee R., Zhao X., Chen W. Aerosol-, but not intradermal-immunization with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* protects mice against subsequent aerosol challenge with a highly virulent type A strain of the pathogen by an alpha-beta T cell- and interferon gamma- dependent mechanism. *Vaccine*. 2005; 23 (19): 2477 – 2485.
18. Piliipenko V.G., Shhekina T.A., Basilova G.I. Long-term preservation of tularemia bacteria in organism of highly sensitive laboratory and wild rodents and the possibility of latent infection be transformed in acute infectious process. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*. 1983; 8: 108 – 109.

## ИНФОРМАЦИЯ ВОЗ

### Новые руководства по ВИЧ-инфекции помогут Европе достичь амбициозной цели

В глобальном масштабе распространение ВИЧ-инфекции было остановлено и обращено вспять. Однако на протяжении последнего десятилетия число случаев ВИЧ-инфекции в Европейском регионе ВОЗ продолжало расти, достигнув самого большого за всю историю регистрации уровня в 2014 году, когда диагноз ВИЧ-инфекции был поставлен более чем 142 тыс. человек.

«Учитывая новую, амбициозную цель в области устойчивого развития, предполагающую прекращение эпидемии ВИЧ-инфекции к 2030 году, Европе необходимо принять решительные меры и значительно ускорить реализацию ответных мер в отношении эпидемии», – заявил г-н Martin Donoghue, советник по вопросам ВИЧ/СПИДа и гепатита Объединенной программы ЕРБ ВОЗ по борьбе с туберкулезом, ВИЧ-инфекцией/СПИДом и гепатитом.

ВОЗ выпустила ряд новых руководств, чтобы помочь странам в усилении принимаемых ими мер в ответ на эпидемию ВИЧ-инфекции.

В одном из руководств даются рекомендации относительно того, когда следует начинать антиретровирусную терапию и проводить доконтактную профилактику ВИЧ-инфекции. Согласно новым рекомендациям, всем инфицированным ВИЧ, независимо от стадии заболевания, необходимо получать антиретровирусную терапию, а неинфицированным, но подвергающимся значительному риску инфицирования ВИЧ, следует предлагать ежедневное доконтактное профилактическое лечение перораль-

ными препаратами в качестве дополнительного варианта профилактики. «Эти две крайне важные рекомендации в существенной мере дополняют друг друга, давая людям, живущим с ВИЧ, и их ВИЧ-отрицательным партнерам возможность поддерживать друг друга в их усилиях по предупреждению передачи ВИЧ», – отметил г-н Henrik Arildsen – человек, живущий с ВИЧ, и бывший председатель сетевых организаций ВИЧ-Дания и ВИЧ-Европа.

ВОЗ выпустила также новое сводное руководство по тестированию на ВИЧ.

Руководства будут поддерживать страны в достижении новых глобальных целевых ориентиров – 90 – 90 – 90: 90% людей, живущих с ВИЧ, знают о своем статусе; 90% людей с диагнозом ВИЧ-инфекции, получают лечение; 90% людей, получающих лечение, достигают вирусной супрессии.

Учитывая, что почти половина новых случаев ВИЧ-инфекции в Европе диагностируется на поздней стадии (количество клеток CD4 менее 350/мм<sup>3</sup>) и большинство стран еще очень далеки от достижения первого из трех целевых ориентиров – 90 – 90 – 90, новое руководство в отношении тестирования на ВИЧ предлагает стратегические подходы, которые будут необходимы странам для того, чтобы сократить число людей, живущих с ВИЧ и не знающих о своем диагнозе.

Источник: <http://www.who.int/hiv/pub/>