

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУЛЯРЕМИИ ЖИВОТНЫХ С РАЗНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К ИНФЕКЦИИ

А.А. Горбатов¹, Г.М. Титарева¹, Т.И. Комбарова¹, Р.З. Шайхутдинова¹, Т.Б. Кравченко¹, Р.И. Миронова¹, И.В. Бахтеева¹, Н.В. Аронова², Н.В. Павлович², А.Н. Мокриевич¹, В.В. Фирстова¹

¹ ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия

² ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Туляремия является антропозоонозной инфекцией, вызываемой бактериями *Francisella tularensis*. В клинической и санитарно-эпидемиологической практике традиционными методами диагностики этого заболевания являются серологические реакции по обнаружению специфических антител, которые служат основанием для постановки диагноза у больного и позволяют оценивать напряженность иммунитета вакцинированных людей. Ранее было показано, что специфические антитела в сыворотке крови переболевших туляремией людей, в отличие от вакцинированных живой туляремийной вакциной *F. tularensis* 15 НИИЭГ, могут взаимодействовать со специфическими эпитопами на молекулах липополисахаридов, выделенных из штаммов различных подвидов — *F. tularensis* (ЛПС Ft) и *F. novicida* (ЛПС Fn), тогда как в сыворотках крови вакцинированных людей иммуноглобулины к ЛПС Fn отсутствуют. Нами были проведены эксперименты по выявлению антител, обладающих сходной специфичностью, с использованием лабораторных животных различных видов — мышей, морских свинок и крыс, обладающих различной чувствительностью к туляремии, и штамма живой туляремийной вакцины и вирулентных штаммов для моделирования вакцинального и инфекционного процессов соответственно. Разработан методический подход, позволяющий проводить анализ гуморального ответа при моделировании инфекционного процесса у высокочувствительных к туляремии животных — мышей линии BALB/c и морских свинок, заключающийся в предварительной иммунизации живой туляремийной вакциной с последующим заражением вирулентными штаммами *F. tularensis*. Было показано, что у животных этих видов как после вакцинации, так и после заражения вирулентными штаммами происходит индукция специфических антител к ЛПС Ft. Было отмечено, что для мышей, в отличие от морских свинок и крыс, как при вакцинации, так и при заражении характерны значительно более низкие титры специфических ЛПС Ft-антител. Не удалось обнаружить специфического взаимодействия мышинной сыворотки с ЛПС Fn. У морских свинок, иммунизированных живой туляремийной вакциной с последующим заражением вирулентным штаммом, с помощью дот-блота было выявлено присутствие иммуноглобулинов с различной антигенной специфичностью к эпитомам ЛПС Ft и ЛПС Fn. В сыворотках крыс также появля-

Адрес для переписки:

Горбатов Алексей Александрович
142279, Россия, Московская область, Серпуховский р-н,
п. Оболенск, ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии.
Тел.: 8 (4967) 36-00-03. Факс: 8 (4967) 36-00-10.
E-mail: gorbатов1986@mail.ru

Contacts:

Alexey A. Gorbatov
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,
Obolensk, State Research Center for Applied Microbiology and
Biotechnology.
Phone: +7 (4967) 36-00-03. Fax: +7 (4967) 36-00-10.
E-mail: gorbатов1986@mail.ru

Библиографическое описание:

Горбатов А.А., Титарева Г.М., Комбарова Т.И., Шайхутдинова Р.З., Кравченко Т.Б., Миронова Р.И., Бахтеева И.В., Аронова Н.В., Павлович Н.В., Мокриевич А.Н., Фирстова В.В. Особенности гуморального ответа при экспериментальной туляремии животных с разной чувствительностью к инфекции // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 262–272. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-262-272

Citation:

Gorbato A.A., Titareva G.M., Kombarova T.I., Shaikhutdinova R.Z., Kravchenko T.B., Mironova R.I., Bakhteeva I.V., Aronova N.V., Pavlovich N.V., Mokrievich A.N., Firstova V.V. Features of humoral answer in experimental animal tularemia with different sensitivity to infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 262–272. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-262-272

лись антитела к ЛПС Fn при их инфицировании вирулентными, но не вакцинным, штаммами. Таким образом, на модели экспериментальной туляремии с использованием крыс и морских свинок были подтверждены полученные ранее данные о формировании иммуноглобулинов с различной антигенной специфичностью и продемонстрирована диагностическая значимость и целесообразность использования ЛПС Fn для подтверждения туляремийной инфекции у людей.

Ключевые слова: экспериментальная туляремия, липополисахарид *F. tularensis*, липополисахарид *F. novicida*, O-антиген, специфические антитела.

FEATURES OF HUMORAL ANSWER IN EXPERIMENTAL ANIMAL TULAREMIA WITH DIFFERENT SENSITIVITY TO INFECTION

Gorbatov A.A.^a, Titareva G.M.^a, Kombarova T.I.^a, Shaikhutdinova R.Z.^a, Kravchenko T.B.^a, Mironova R.I.^a, Bakhteeva I.V.^a, Aronova N.V.^b, Pavlovich N.V.^b, Mokrievich A.N.^a, Firstova V.V.^a

^a State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

^b Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Tularemia is an anthroponozoonotic infection caused by *Francisella tularensis*. In clinical and sanitary-epidemiological practice, traditional diagnostics methods in tularemia are based on serological assays for detecting specific antibodies, allowing to diagnose it and estimate durability of patients' immunity after vaccination. Previously, it was shown that specific serum antibodies in patients recovered after tularemia, unlike to those vaccinated with the live tularemia vaccine *F. tularensis* 15 NIIEG, can interact with specific epitopes on lipopolysaccharides isolated from strains of various subspecies — *F. tularensis* (Ft) and *F. novicida* (LPS Fn), while LPS Fn-specific immunoglobulins are lacked in the blood of vaccinated individuals. A set of experiments on identifying antibodies with similar specificity in laboratory animals of various species — mice, guinea pigs and rats with differed sensitivity to tularemia, administered with live tularemia vaccine strain as well as virulent *F. tularensis* strains to simulate vaccine-mediated and infectious processes, respectively was conducted. A methodical approach has been developed that allows to analyze humoral response in modelled infectious process in animals highly sensitive to tularemia such as BALB/c mice and guinea pigs that consisted of preliminary immunization with live tularemia vaccine followed by infection with virulent *F. tularensis* strains. It was shown that induction of specific anti-LPS Ft antibodies occurred in these animal species, both after vaccination and infection with virulent strains. It was noted that, unlike guinea pigs and rats, mice both during vaccination and infection were characterized by significantly lower titers of LPS Ft-specific antibodies. However, no specific interaction between mouse serum and LPS Fn might be detected. Moreover, two types of immunoglobulins with different antigen specificities to the LPS Ft and LPS Fn epitopes were detected by dot-blot analysis in guinea pigs immunized with live tularemia vaccine, followed by infection with a virulent strain. In addition, antibodies to LPS Fn were also detected in the serum of rats infected with virulent, but not vaccine-based, *F. tularensis* strains. Thus, previous experimental data on the production of immunoglobulins with different antigenic specificity were confirmed in an experimental tularemia modelled in rats and guinea pigs that demonstrated a diagnostic significance and feasibility of using LPS Fn to confirm tularemia infection in humans.

Key words: experimental tularemia, lipopolysaccharide *F. tularensis*, lipopolysaccharide *F. novicida*, O-antigen, specific antibodies.

Введение

Туляремия является антропозоонозной инфекцией, вызываемой бактериями *Francisella tularensis*. Этот возбудитель патогенен для млекопитающих многих видов, особенно для грызунов и некоторых насекомоядных животных. Периодические вспышки массовых заболеваний людей, сохранение стабильных эпизоотически активных природных очагов туляремии требуют совершенствования серодиагностики этого заболевания.

В клинической и санитарно-эпидемиологической практике традиционными методами при диагностике являются серологические реакции, направленные на обнаружение специфических противотуляремийных антител,

которые служат основанием для постановки диагноза у больного и позволяют оценивать напряженность иммунитета вакцинированных людей. Кроме этого, выявление антител у животных имеет важное значение для мониторинга эпизоотий туляремии. Учитывая, что в эндемичных районах проводится регулярная вакцинация людей против туляремии (только в 2017 г. в Российской Федерации было вакцинировано 1 128 154 человек) [3], существует необходимость дифференцировать природу происхождения специфических антител (инфекционные или вакцинальные) в каждом конкретном случае.

Одним из наиболее значимых антигенов при диагностике туляремии является липополисахарид (ЛПС) — основной компонент клеточной стенки возбудителя. В настоящее время при-

нято различать четыре подвида туляремийного микроба: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (тип А), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (тип В), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* и *F. tularensis* subsp. *novicida* [9], при этом ЛПС трех первых, эпидемически значимых, подвидов имеет одинаковую структуру. Известно, что макромолекула ЛПС может быть условно разделена на 3 домена. Липид А — высокогидрофобная часть молекулы. К нему ковалентно присоединяется коровая часть, которая соединена с полимером из повторяющихся сахаров, называемым О-полисахаридом, или О-антигеном. Липид А является своего рода «якорем», закрепляющим молекулы ЛПС в мембране за счет гидрофобных взаимодействий друг с другом и с фосфолипидным слоем [7, 11, 12, 13, 14, 21]. У *F. tularensis*, как и у большинства грам-отрицательных бактерий, липид А представляет собой фосфолирированный дисахарид, построенный из двух остатков D-глюкозамина, ацилированный четырьмя жирнокислотными остатками [8]. Как правило, антигенные детерминанты расположены на О-полисахариде, который и обуславливает иммунологическую индивидуальность серотипов, штаммов, подвидов микроорганизмов. Спектр вырабатываемых макроорганизмом антител зависит от структуры и длины О-антигена.

Химическая структура О-антигена липополисахарида разных подвидов *F. tularensis*, являющаяся вместе с кором гидрофильной частью молекулы, хорошо изучена. Для голарктического, среднеазиатского и неарктического подвидов он представляет собой повторяющийся тетрасахарид, состоящий из последовательно соединенных углеводов α -D-GalNAcAN и α -D-GalNAcAN, которые соединены с β -D-QuiNAc и β -DQui4NFm. Структура О-антигена *F. novicida* также представляет собой повторяющийся тетрасахарид, но имеет некоторые отличия: вместо β -DQui4NFm имеется еще один остаток α -D-GalNAcAN, а вместо β -D-QuiNAc — остаток β -DQui2NAc4NAc [8, 18, 19].

Ранее было показано, что при инфекционном процессе у человека вырабатываются специфические антитела, которые связываются как с ЛПС *F. tularensis*, так и с ЛПС *F. novicida*, в то время как у вакцинированных живой туляремийной вакциной обнаруживаются антитела только к ЛПС *F. tularensis* [1]. Невозможность получения достаточно большой выборки сывороток людей, переболевших туляремией, побудило нас разработать методологию более углубленного изучения выявленного феномена на лабораторных животных.

Нами были проведены эксперименты по моделированию вакцинного и инфекционного процессов на мышах, морских свинках и крысах с учетом их чувствительности к туляремии.

Цель исследований — изучение особенностей гуморального иммунного ответа при экспериментальной туляремии на лабораторных животных с разной чувствительностью к инфекции.

Материалы и методы

Штаммы. Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ subsp. *holarctica* и вирулентные штаммы *F. tularensis* 503 subsp. *holarctica*; *F. tularensis* А-678 и 120 subsp. *mediasiatica*; *F. tularensis* Schu subsp. *tularensis* были получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (ФБУН ГНЦПМБ, п. Оболенск, Московская область). Культуры *F. tularensis* выращивали при температуре 37°C на плотной питательной среде FT-агар с черным альбумином (производство ФБУН ГНЦПМБ). Стандартные суспензии клеток туляремийного микроба готовили в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) с использованием стандарта мутности (СОС 42-28-85-2012 ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России).

Животные. В экспериментах с животными были использованы мыши инбредной линии BALB/c(H2d) (6–8 недель, масса 18–20 г), крысы Wistar (5–7 недель, вес 200–220 г) и морские свинки (5–7 недель, вес 350–450 г). Животные получены из филиала института биоорганической химии питомника «Пушино» и филиала «Андреевка» ФГБУ Научный центр биомедицинских технологий РАН. Работы с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации и ветеринарным протоколом ВП-2017/6, утвержденным Комиссией по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ. Эксперименты и эвтаназию животных осуществляли в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Получение образцов сывороток от лабораторных животных. Экспериментальные животные были иммунизированы вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и/или инфицированы штаммами *F. tularensis* разных подвидов: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*. У мышей кровь получали из ретроорбитального синуса, от морских свинок кровь отбирали из краевой ушной вены, а при тотальном заборе крови морскую свинку подвергали анестезии и проводили забор крови из сердца. У крыс забор крови проводили из сердца после предварительной анестезии.

Методы выделения ЛПС. Выделение ЛПС из штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. novicida* Utah 112 проводили методом экстракции по Westphal [1965] [20]. Для экстракции бактериальные клетки прогревали при температуре 68°C в 45%-ном водном растворе фенола. После охлаждения, для разделения фаз, смесь центрифугировали. В водной фазе содержались водорастворимые компоненты — нуклеиновые кислоты, полисахариды и гидрофильные молекулы ЛПС, в фенольной фазе содержалась большая часть белков. Нерастворимый материал находился в интерфазе. Водный раствор, содержащий ЛПС, осторожно отбирали и диализовали против дистиллированной воды в течение 4 суток, контролируя процесс диализа определением изменения значения оптической плотности раствора при длине волны 260 нм [21]. Дальнейшие этапы очистки включали в себя последовательную обработку ферментами ДНК-азой, РНК-азой, протеиназой К, 3-кратное ультрацентрифугирование при 100 000g. Чистоту полученных препаратов ЛПС контролировали, определяя содержание белков при электрофоретическом разделении молекул ЛПС в ПААГ окрашиванием Кумасси, содержание нуклеиновых кислот — в агарозном геле окрашиванием бромистым этидием.

Дот-блот. На нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences, Швеция) точно наносили препараты очищенных ЛПС в количестве 5 мкг. После высыхания мембрану инкубировали в растворе фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащем 5% обезжиренного молока (Bio-Rad, США) в течение 40 мин при 37°C. После этого мембраны инкубировали 1 ч при 37°C с исследуемыми сыворотками в разведении 1:100. После этапа отмывки ФСБ (трижды по 5 мин) мембраны инкубировали 40 мин при 37°C в растворе рабочего разведения козьих антител к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США) (0,1 мл/лунка); козьих антител к IgG крысы, конъюгированных с пероксидазой хрена (Biomedical, Франция) и кроличьих антител к IgG морской свинки, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США). После отмывки (трижды по 5 мин) мембрану помещали в раствор субстрата (0,05% диаминобензидина, 0,015% перекиси водорода, 0,01 М ФСБ (pH 7,4). Результаты регистрировали через 5–10 мин, останавливая реакцию промыванием мембраны в дистиллированной воде.

Иммуноферментный анализ [4]. Планшеты для проведения анализа (Nunc, MaxiSorp, Дания) в течение ночи при температуре 4°C сенсibilизировали раствором антигена ЛПС Ft (5 мкг/мл — 0,1 мл/лунка) в 0,01 М натрий-карбонатном буфере (pH 9,6). Планшет промывали однократно в растворе фосфат-

но-солевого буфера с твин-20 (ФСБ-Т) (0,2 мл/лунка) с использованием автоматической системы отмывки «Проплан» (Пикон, Россия). Дальнейшие процедуры инкубации планшета с реагентами проводили при температуре 37°C на ротационном шейкере при 150 об./мин. Для блокирования участков неспецифической сорбции в лунки планшета вносили раствор 5% обезжиренного молока в ФСБ и инкубировали в течение часа. После трехкратной промывки ФСБ-Т планшет инкубировали 1 ч с сыворотками крови в объеме 0,1 мл/лунка и в разведении 1:50 с двухкратным шагом титрования. Каждый образец пулированных по группам сывороток вносили в двух повторах. Отмытый планшет инкубировали в течение 30 мин в растворе рабочего разведения козьих антител к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США) (0,1 мл/лунка); козьих антител к IgG крысы, конъюгированных с пероксидазой хрена (Biomedical, Франция) и кроличьих антител к IgG морской свинки, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США). После четырехкратной отмывки ФСБ-Т в лунки планшета добавляли по 0,1 мл свежеприготовленного раствора субстрата (0,2 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, 0,03% перекиси водорода). Ферментативную реакцию останавливали после развития окраски (через 15 мин) добавлением в лунки планшета 0,05 мл 0,1 М серной кислоты и регистрировали оптическую плотность раствора при длине волны 492 нм с помощью планшетного фотометра «Униплан» (Пикон, Россия).

Статистический анализ. Для статистического анализа результатов использовали общепринятые методы статистической обработки данных, а также программы Microsoft Office Excel (Microsoft, США). Результаты 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 $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты

Мышей линии BALB/c и морских свинок, как очень чувствительных и восприимчивых к возбудителю туляремии животных (LD_{50} для вирулентных штаммов составляет единичные клетки), предварительно однократно подкожно иммунизировали вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ — мышей в дозе 30 м.к., морских свинок в дозе 500 м.к., после чего заражали подкожно вирулентными штаммами *F. tularensis* 503, *F. tularensis* A-678 и 120,

F. tularensis Schu в дозе 1000 DCL. Крыс линии Wistar инфицировали теми же вирулентными штаммами как после предварительной вакцинации, так и без нее.

Количество образцов сывороток лабораторных животных, полученных в ходе проведения экспериментов по иммунизации и инфицированию для проведения серодиагностических исследований, представлено в таблице 1.

Для изучения иммунного процесса у мышей линии BALB/с и морских свинок, которых иммунизировали однократно подкожно вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, изучали динамику появления двух видов иммуногло-

Таблица 1. Количество образцов сывороток, полученных от лабораторных животных после иммунизации вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ и инфицированных штаммами *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*

Table 1. Number of serum samples obtained from laboratory animals after immunization with vaccine strain *F. tularensis* 15 NIEG and infected with *F. tularensis* strains of subspecies *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* and *novicida*

Вид лабораторных животных Species of laboratory animals	Обработка животных Type of manipulation	Количество образцов сыворотки Amount of serum samples
Мыши Mice	иммунизация immunization	150
	последующее инфицирование штаммами разных подвидов subsequent infection with strains of different subspecies	150
	интактные intact	30
Морские свинки Guinea pigs	иммунизация immunization	40
	последующее инфицирование штаммами разных подвидов subsequent infection with strains of different subspecies	30
	интактные intact	10
Крысы Rats	иммунизация immunization	30
	инфицирование штаммами разных подвидов infection with strains of different subspecies	60

булинов с различной антигенной специфичностью к эпитопам ЛПС Ft и ЛПС Fn методами ИФА и дот-блота.

Титр антител к ЛПС Ft определяли методом ИФА на 30, 60, 90, 120, 150, 180 сутки после иммунизации. Данные реципрокных титров к ЛПС Ft в сыворотках мышей и морских свинок приведены на рисунке 1.

Представленные данные свидетельствуют, что титры специфических туляремийных антител в сыворотках вакцинированных мышей и морских свинок нарастают и сохраняются до 150 суток, после чего начинают снижаться; при этом следует отметить, что у морских свинок он в среднем в 5 раз выше, чем у мышей.

Методом дот-блота антитела к ЛПС Fn в сыворотках мышей линии BALB/с и морских свинок, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, обнаружить не удалось, что согласуется с данными Ароновой (2005) [1].

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

У мышей после заражения наблюдали падение веса, что является показателем физиологического состояния животных и может служить одним из критериев развития инфекционного процесса, однако гибели животных в течение периода наблюдения не отмечали. У морских свинок, зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*) и *F. tularensis* A-678 (subsp. *mediasiatica*), также наблюдали потерю веса, снижение аппетита, понижение активности, у отдельных животных наблюдали увеличение паховых лимфоузлов. Наблюдение за инфицированными животными вели до 28 дня, к этому сроку наблюдали восстановление веса и нормализацию всех поведенческих реакций. У морских свинок, зараженных вирулентным штаммом *F. tularensis* Schu (subsp. *tularensis*), наблюдали падение веса с 3–4 суток после инфицирования, к 14 дню наблюдений они все погибли. Таким образом, для дальнейшего исследования нами было получено по 5 сывороток мышей после заражения вирулентными штаммами всех подвидов и по 5 сывороток морских свинок после заражения вирулентными штаммами 503 и A-678. Специфические антитела определяли методом ИФА с ЛПС Ft и дот-блотом с ЛПС Ft и ЛПС Fn (табл. 2).

Титр специфических антител к ЛПС Ft после заражения вирулентными штаммами в мышинных сыворотках увеличивался по сравнению

с вакцинальным незначительно — в 2–8 раз (рис. 1, табл. 2). У морских свинок повышение титра антител после заражения было более выявлено (до 40 раз) (рис. 1, табл. 2).

Оценка специфических взаимодействий с ЛПС Ft и ЛПС Fn методом дот-блота выявила интересную закономерность: с ЛПС Ft хорошо реагировали как сыворотки инфицированных мышей, так и сыворотки инфицированных морских свинок. В отличие от этого, ЛПС Fn распознавался только иммунными сыворотками переболевших морских свинок, тогда как реакции связывания ЛПС Fn с иммуноглобулинами сывороток мышей не наблюдались (табл. 2).

Крысы, как и человек, являются высоковосприимчивыми, но малочувствительными к туляремии, поэтому инфекционный процесс мы изучали как на иммунных, так и на невакцинированных животных. Для изучения поствакцинального иммунитета крыс линии Wistar (в количестве 5 шт.) иммунизировали в дозе 1000 м.к./крысу вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Постинфекционный иммунитет исследовали при заражении крыс природными штаммами *F. tularensis* 503 (subsp. *holarctica*), A-678 (subsp. *mediasiatica*) и Schu (subsp. *tularensis*) дозами 100, 1000 и 10 000 м.к./крысу (по 3 животных в группе) как с предварительной вакцинацией (104 м.к./крысу, по 3 животных в группе), так и без иммунизации.

На 28 сутки оценивали титр антител к ЛПС Ft методом ИФА (рис. 2), оценку специфичности взаимодействий с ЛПС Ft и ЛПС Fn проводили

методом дот-блота (табл. 3). При вакцинации крыс титры антител не превышали значений 1:1000, антитела к ЛПС Fn выявлялись только у животных, инфицированных вирулентными штаммами, наибольшее повышение титра антител при заражении вызвал штамм Schu (subsp. *tularensis*) (рис. 2).

Примечательно, что при заражении вирулентными штаммами без предварительной вакцинации наиболее низкая инфицирующая доза вызывала наибольшее нарастание титра антител независимо от подвида заражающего штамма. Вероятно, острый инфекционный процесс вызывает некоторое угнетение процесса антителообразования, которое к моменту отбора крови еще не достигло максимума (рис. 2).

Таким образом, данные, полученные на модели экспериментальной туляремии с использованием лабораторных животных трех видов, свидетельствуют, что у крыс и морских свинок происходит выработка антител, которые связываются как с ЛПС Ft, так и с ЛПС Fn. В случае вакцинации штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ этих видов животных специфических взаимодействий иммунных сывороток с ЛПС Fn не наблюдали, хотя сыворотки хорошо реагировали с ЛПС Ft.

При проведении экспериментов по вакцинации и по заражению мышей вирулентными штаммами нам не удалось обнаружить специфических взаимодействий мышинных сывороток с ЛПС Fn, хотя они хорошо распознавали ЛПС Ft.

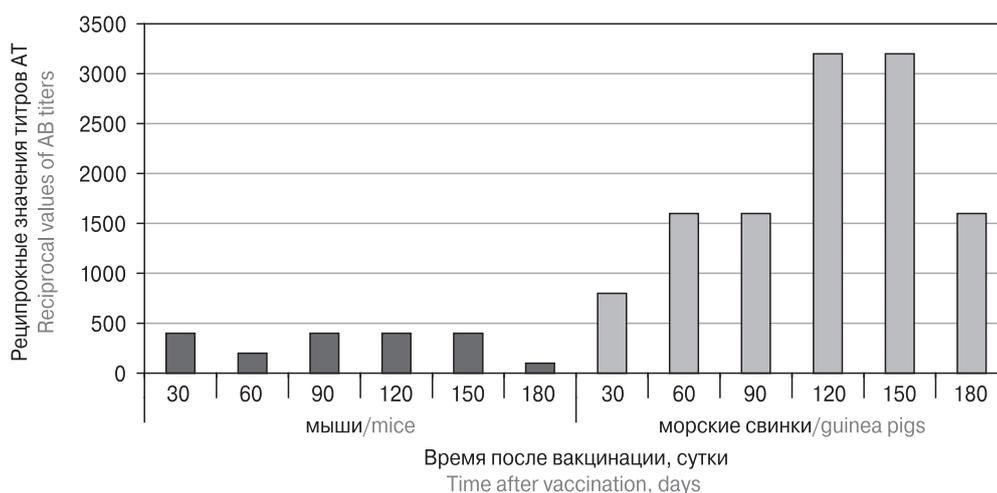


Рисунок 1. Динамика изменения титров специфических антител к ЛПС Ft методом ИФА у лабораторных животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Figure 1. Dynamics of anti-LPS Ft antibody titers in laboratory animals immunized with strain *F. tularensis* 15 NIEG assessed by ELISA

Примечание. На каждом сроке отбора сыворотки каждого вида животных объединяли в одну группу и изучали как один образец.

Note. Sera from each animal species were collected and pooled at each time point after immunization with strain *F. tularensis* 15 NIEG.

Обсуждение

При диагностике туляремии оценка клеточного иммунитета является самым надежным методом специфической диагностики, тем не менее в обычной практической медицине наиболее распространенным остается определение специфических антител к возбудителю туляремии в сыворотке крови [4, 5, 15, 16, 17]. Традиционно в агглютинационных тестах для серодиагностики используются убитые цельные микробные клетки, однако в последние годы для выявления специфических антител чаще всего используют очищенный препарат ЛПС *F. tularensis* [6, 10, 15, 16, 17].

Нами проведена оценка целесообразности определения специфичности индуцируемых антител к эпитомам ЛПС Ft и ЛПС Fn у лабо-

раторных животных разной чувствительности к туляремии для оценки инфекционного процесса, вызываемого вирулентными штаммами возбудителя туляремии трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*), а также поствакцинального иммунного ответа.

Для этих целей была получена коллекция из более 300 экспериментальных иммунных сывороток лабораторных животных — мышей, морских свинок и крыс, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ с последующим заражением вирулентными штаммами различных подвидов.

Сыворотки животных, зараженных вирулентными штаммами разных подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*), позволили нам объективно оценить возможность проведения дифференциации инфекционного и вакци-

Таблица 2. Выявление специфических антител к ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ (ЛПС Ft) и ЛПС *F. novicida* (ЛПС Fn) в сыворотках мышей линии BALB/c и морских свинок после заражения вирулентными штаммами разных подвидов

Table 2. Identification of specific antibodies to LPS *F. tularensis* 15 NIEEG (LPS Ft) and LPS *F. novicida* (LPS Fn) in the sera obtained from BALB/c mice and guinea pigs after infection with virulent strains of different subspecies

Вид животного Species of laboratory animals	Заражающий штамм <i>F. tularensis</i> Infectious strain of <i>F. tularensis</i>	Подвид заражающего штамма Subspecies of infectious strain	Определение специфических антител Detection of specific antibodies		
			ИФА с ЛПС Ft ELISA with LPS Ft	Дот-блот с ЛПС Ft Dot-blot with LPS Ft	Дот-блот с ЛПС Fn Dot-blot with LPS Fn
Мыши линии BALB/c BALB/c mice	503	<i>holarctica</i>	1:400	+	–
	503		1:400	+	–
	503		1:400	+	–
	503		1:800	+	–
	503		1:200	+	–
	A-678	<i>mediasiatica</i>	1:800	+	–
	A-678		1:400	+	–
	A-678		1:800	+	–
	A-678		1:800	+	–
	A-678		1:800	+	–
	Schu	<i>tularensis</i>	1:1600	+	–
	Schu		1:800	+	–
	Schu		1:800	+	–
	Schu		1:1600	+	–
	Schu		1:800	+	–
Морские свинки Guinea pigs	503	<i>holarctica</i>	1:102400	+	+
	503		1:12800	+	+
	503		1:51600	+	+
	503		1:51600	+	+
	503		1:51600	+	+
	A-678	<i>mediasiatica</i>	1:6400	+	+
	A-678		1:51600	+	+
	A-678		1:12800	+	+
	A-678		1:6400	+	+
	A-678		1:51600	+	+

нального процессов по спектру специфических антител, связывающихся с ЛПС *F. tularensis* и с ЛПС *F. novicida*. Появление в сыворотках инфицированных животных антител, способных взаимодействовать с ЛПС Fn, может быть обусловлено либо более интенсивным процессом антителообразования, сопровождающего инфекционный процесс, либо выработкой иного, более широкого, спектра специфических антител, которые могут связываться и с молекулой ЛПС *F. novicida*. В экспериментах по перекрестному истощению сывороток, полученных после инфицирования штаммами *F. tularensis* и *F. novicida*, было показано, что в процессе

развития туляремийной инфекции, молекулы ЛПС бактериальной клетки подвергаются антигенной модификации, вследствие чего появляются эпитопы, специфичные не только для ЛПС Ft, но и для ЛПС Fn [1].

Обращают на себя внимание данные, полученные при исследовании сывороток мышей линии BALB/c: у этого вида животных в сыворотках не удалось обнаружить антитела к ЛПС Fn ни после вакцинации, ни после заражения вирулентными штаммами. Считается, что тяжелая форма течения туляремии у мышей линии BALB/c связана с особенностями их иммунной системы [2]. Это вызывает развитие транзитор-

Таблица 3. Дот-блоты сывороток крыс, вакцинированных штаммом 15 НИИЭГ и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* голарктического (503), среднеазиатского (A-678 и 120) и неарктического подвидов (Schu), с ЛПС Ft и ЛПС Fn в качестве антигенов

Table 3. Dot-blotting with sera obtained from rats vaccinated with the 15 NIEG strain and infected with virulent strains of *F. tularensis* holarctica (503), mediasiatica (A-678 and 120) and tularensis subspecies (Schu), recognizing antigens LPS Ft and LPS Fn

<i>F. tularensis</i> , подвид <i>F. tularensis</i> , subspecies	Характеристики Characteristics	<i>F. tularensis</i> , штаммы <i>F. tularensis</i> , strains	Доза заражения, м.к./крысу Dose of infection, CFU/rat	Дот-блоты с антигенами ЛПС Ft и ЛПС Fn Dot-blot with LPS Ft and LPS Fn
<i>holarctica</i>	Вакцинный Vaccine strain	15НИИЭГ NIEG	10 000	
			1000	
	Вирулентный Virulent strain	503	10 000	
1000				
<i>mediasiatica</i>	Вирулентный (Средняя Азия) Virulent (Middle Asia) strain	120	1000	
			10 000	
	Вирулентный (Алтай) Virulent (Altaic) strain	A-678	100	
			1000	
			10 000	
	<i>tularensis</i>	Вирулентный Virulent strain	Schu	100
1000				
10 000				

Примечание. *В нижнем левом углу нанесен ЛПС Fn, в верхнем правом — ЛПС Ft.

Note. *LPS Fn and LPS Ft were placed in the lower left and upper right corner, respectively.

ного иммунодефицита, определяя низкий уровень выработки специфических антител (невысокие значения титров антител к ЛПС Ft). При этом доля тех антител, которые распознают эпитопы на молекуле ЛПС Fn, возможно, находится за порогом чувствительности метода их определения. С другой стороны, не исключено, что особенности иммунной системы мышей не позволяют им реагировать на вирулентные штаммы тем спектром антител, которые присущи морским свинкам и крысам. При этом экспериментальная туляремия у мышей очень часто используется при моделировании инфекционного процесса, хотя очевидно, что иммунный ответ в организме мышей отличается от процессов, происходящих в организме человека.

Тенденция нарастания титра антител для каждого вида животных при заражении вирулентными штаммами имела своеобразный характер. Так, для крыс и мышей при вакцинации были характерны меньшие титры антител, чем для морских свинок. В случае инфицирования иммунных животных вирулентными штаммами наибольшее повышение титра антител мы также наблюдали у морских свинок. Для крыс заражение штаммом Schu (subsp. *tularensis*) после вакцинации вызвало большее повышение титров антител, чем заражение штаммами подвидов *holarctica* и *mediasiatica*.

При заражении крыс вирулентными штаммами без предварительной вакцинации было обнаружено, что наиболее низкая из заражающих доз индуцирует максимальное нарастание

титра антител для всех подвидов *F. tularensis*. Вероятно, что высокая инфицирующая доза, вызывающая у крыс иммуносупрессию, индуцирует более низкую продукцию специфических иммуноглобулинов.

Выводы

1. В модельных экспериментах на лабораторных животных — морских свинках и крысах — был изучен спектр специфических антител, вырабатываемых при инфицировании *F. tularensis*, и достоверно установлена диагностическая значимость использования ЛПС Fn для подтверждения заболевания туляремией. На репрезентативной выборке сывороток лабораторных животных, вакцинированных и инфицированных вирулентными штаммами, удалось подтвердить, что наличие антител к липополисахариду *F. novicida* может служить сигнальным признаком для дифференциации инфекционного и вакцинного процессов у животных.

2. Антитела к ЛПС Fn были обнаружены во всех сыворотках морских свинок и крыс, инфицированных вирулентными штаммами всех трех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*). При иммунизации животных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ специфических взаимодействий антител сывороток всех видов животных с данным антигеном не выявили. Следовательно, обнаружение антител к липополисахариду *F. novicida* может служить доказательством инфицирования вирулентными штаммами и яв-

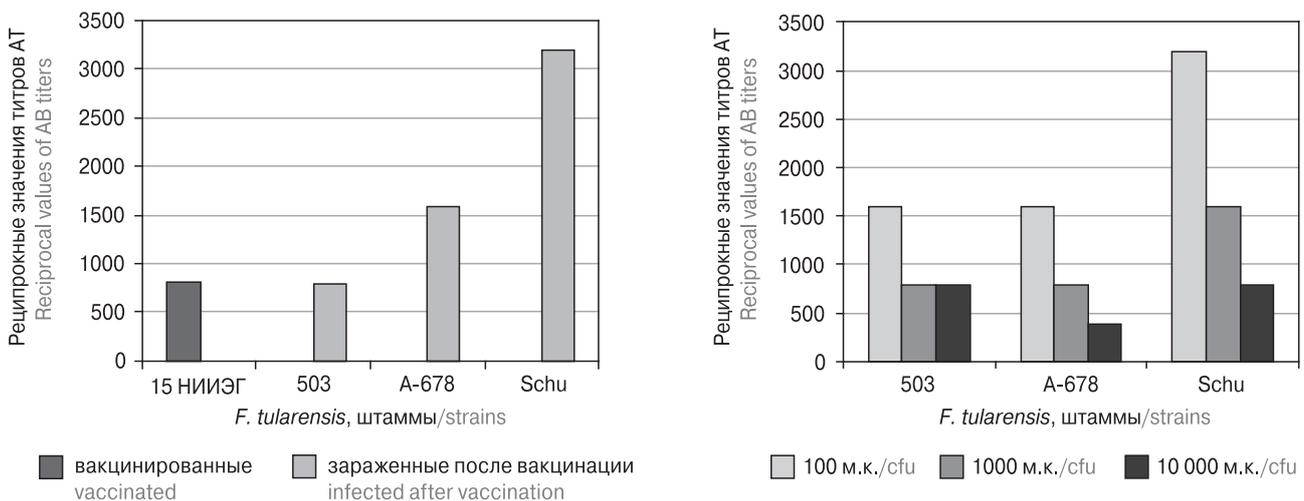


Рисунок 2. Реципрокные значения титров специфических антител к ЛПС Ft, определенные методом ИФА у крыс линии Wistar

Figure 2. Reciprocal values of titres of specific antibodies to LPS Ft, determined by ELISA in Wistar rats

Примечания. А — у крыс, вакцинированных и зараженных вирулентными штаммами *F. tularensis* разных подвидов в дозе 10^4 м.к.; Б — у крыс, зараженных разными дозами вирулентных штаммов *F. tularensis* разных подвидов без вакцинации. Сыворотки пулировали по группам.

Notes. A — in rats vaccinated and infected with virulent *F. tularensis* strains of different subspecies in a dose of 10^4 CFU; B — in rats infected with different doses virulent *F. tularensis* strains of different subspecies without vaccination. The sera were pooled into groups.

ляться дифференциальным признаком инфекционного и вакцинного процессов.

3. Анализ полученных результатов показывает, что при изучении гуморального звена иммунитета при туляремии важное значение имеет вид используемого лабораторного животного. Наиболее приближенными по иммунному ответу к организму человека, по нашим данным, являются крысы и морские свинки.

4. Полученные нами результаты доказывают перспективность разработки диагностических систем с использованием в качестве дополнительного антигена ЛПС F_н, наличие антител к которому позволяет дифференцировать ин-

фекционный и вакцинный процесс при туляремии. Использование таких тестов в экспресс-варианте, к примеру, в виде иммунохроматографических тестов (ИХ-тестов), в широкой эпидемиологической практике может ускорить и улучшить результативность при мониторинге заболеваемости людей и животных туляремией в эндемичных очагах.

Конфликт интересов

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы/References

1. Аронова Н.В., Павлович Н.В. Фазовые вариации липополисахарида возбудителя туляремии при инфекции и иммунизации человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005. № 4. С. 8–12. [Aronova N.V., Pavlovich N.V. Phase variations of lipopolysaccharide francisella tularensis in human infection and immunization. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2005, no. 4, pp. 8–12. (In Russ.)]
2. Комбарова Т.И., Павлов В.М., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Борзилов А.И., Коробова О.В., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Мокриевич А.Н. Сравнительная оценка реактогенности туляремийной вакцины на различных биомоделях // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013. Т. 71, № 4. С. 54–62. [Kombarova T.I., Pavlov V.M., Kravchenko T.B., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Borzilov A.I., Korobova O.V., Vakhrameeva G.M., Mironova R.I., Mokrievich A.N. Comparative evaluation of reactogenicity tularemia vaccine using of different biomodels. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2013, vol. 71, no. 4, pp. 54–62. doi: 10.31631/2073-3046-2015-14-6-74-86 (In Russ.)]
3. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Пакскина Н.Д., Холин А.В., Мазепа А.В., Куликалова Е.С., Транквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Туляремия: актуальные вопросы и прогноз эпидемической ситуации на территории Российской Федерации в 2018 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2018. № 1. С. 22–29. [Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Pakskina N.D., Kholin A.V., Mazepa A.V., Kulikalova E.S., Trankvilevsky D.V., Khramov M.V., Dyatlov I.A. Tularemia: relevant issues and forecast of epidemic situation in the territory of the Russian Federation in 2018. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2018, no. 1, pp. 22–29. doi: 10.21055/0370-1069-2018-1-22-29 (In Russ.)]
4. Мещерякова И.С., Умнова Н.Г., Шаханина К.Л., Павлова И.П. Использование иммуноферментного метода ELISA для выявления возбудителя туляремии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1988. Т. 65, № 2. С. 109–112. [Meshcheryakova I.S. Umnova N.G., Shakhanina K.L., Pavlova I.P. Using ELISA immunoenzymatic method for detecting the causative agent of tularemia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1988, vol. 65, no. 2, pp. 109–112. (In Russ.)]
5. Anderson R.V., Crane D.D., Bosio C.M. Long lived protection against pneumonic tularemia is correlated with cellular immunity in peripheral, not pulmonary, organs. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 40, pp. 6562–6572. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.07.072
6. Dahlstrand S., Ringertz O., Zetterberg B. Airborne tularemia in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1971, vol. 3, pp. 7–16. doi: 10.3109/inf.1971.3.issue-1.02
7. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 1969, vol. 9, pp. 245–249.
8. Gunn J.S., Ernst R.K. The structure and function of Francisella lipopolysaccharide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, vol. 1105, pp. 202–218. doi: 10.1196/annals.1409.006
9. Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of Francisella. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, vol. 1105, pp. 30–66. doi: 10.1196/annals.1409.011
10. Porsch-Ozcrumez M., Kischel N., Priebe H., Spletstoesser W., Finke E.J., Grunow R. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004, vol. 11, pp. 1008–1015. doi: 10.1128/CDLI.11.6.1008-1015.2004
11. Raetz C.R.H., Guan Z., Ingram B.O., Six D.A., Song F., Wang X. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J. Lipid Res.*, 2009, vol. 50, pp. 103–108. doi: 10.1194/jlr.R800060-JLR200
12. Raetz C.R.H., Reynolds C.M., Trent M.S., Bishop R.E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 2007, vol. 76, pp. 295–329. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803
13. Raetz C.R.H., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, vol. 71, pp. 635–700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
14. Ransmeier J.C., Ewing C.L. The agglutination reaction in tularemia. *J. Infect. Dis.*, 1941, vol. 69, pp. 193–205.
15. Schmitt P., Spletstoesser W., Porsch-Ozcrumez M., Finke E.J., Grunow R. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. *Epidemiol. Infect.*, 2005, vol. 133, pp. 759–766.
16. Sharma N., Hotta A., Yamamoto Y., Fujita O., Uda A., Morikawa S., Yamada A., Tanabayashi K. Detection of Francisella tularensis-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2013, vol. 20, pp. 9–16. doi: 10.1128/CVI.00516-12

17. Spletstoesser W., Guglielmo-Viret V., Seibold E., Thullier P. Evaluation of an immunochromatographic test for rapid and reliable serodiagnosis of human tularemia and detection of Francisella tularensis-specific antibodies in sera from different mammalian species. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, vol. 48, pp. 1629–1634. doi: 10.1128/JCM.01475-09
18. Vinogradov E., Perry M.B., Conlan J.W. Structural analysis of Francisella tularensis lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 2002, vol. 269, no. 24, pp. 6112–6118.
19. Vinogradov E.V., Shashkov A.S., Knirel, Y.A. Kochetkov N.K., Tochamysheva N.V., Averin S.F., Goncharova O.V., Khlebnikov V.S. Structure of the O-antigen of Francisella tularensis strain 15. *Carbohydr. Res.*, 1991, vol. 214, pp. 289–297.
20. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Meth. Carbohydr. Chem.*, 1965, vol. 5, pp. 83–91.
21. Wetmur J.G., Davidson N.J. Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.*, 1968, vol. 31, p. 349.

Авторы:

Горбатов А.А., младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;

Титарева Г.М., к.м.н., старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;

Комбарова Т.И., к.б.н., старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;

Шайхутдинова Р.З., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории чумы ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;

Кравченко Т.Б., к.б.н., старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;

Миронова Р.И., научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;

Бахтеева И.В., к.м.н., старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;

Аронова Н.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории туляремии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Павлович Н.В., д.м.н., зав. лабораторией туляремии ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;

Мокриевич А.Н., д.м.н., зав. отделом особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;

Фирстова В.В., д.б.н., зав. лабораторией молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия.

Authors:

Gorbatov A.A., Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Titareva G.M., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Kombarova T.I., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Shaikhutdinova R.Z., PhD (Biology), Senior Researcher, Plague Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Kravchenko T.B., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Mironova R.I., Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Bakhteeva I.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Aronova N.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Tularemia Laboratory, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Pavlovich N.V., PhD, MD (Medicine), Head of Tularemia Laboratory, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

Mokrievich A.N., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Firstova V.V., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 27.07.2018
Отправлена на доработку 13.03.2019
Принята к печати 09.04.2019

Received 27.07.2018
Revision received 13.03.2019
Accepted 09.04.2019