

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної  
ветеринарної медицини»

Національна академія аграрних наук України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Зленко Оксана Борисівна**

УДК 619:616.98-078:579.841.95:57.083.33:577.2.08:636

ДИСЕРТАЦІЯ

**Лабораторна діагностика туляремії (імуноферментний аналіз та  
полімеразна ланцюгова реакція), епізоотологічний моніторинг і  
генотипування збудника**

03.00.20 — біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

О.Б.Зленко

Науковий керівник Герілович Антон Павлович, заступник директора з  
наукової роботи ННЦ «ІЕКВМ», доктор ветеринарних наук, професор, член-  
кор. НААН

Харків - 2021

## АНОТАЦІЯ

Зленко О.Б. Лабораторна діагностика туляремії (імуноферментний аналіз та полімеразна ланцюгова реакція), епізоотологічний моніторинг і генотипування збудника. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія». – Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», НААН України, Харків, 2020.

Дисертаційна робота присвячена розробці методу ІФА для діагностики туляремії на основі рекомбінантних антигенів шляхом дослідження сироваток крові від кабанів та людини, конструюванню позитивного контролю для проведення ПЛР щодо наявності генетичного матеріалу збудника туляремії у клінічних зразках і зразках середовища, проведенню молекулярно-генетичного скринінгу та серомоніторингу ситуації з туляремії, а також філогенетичним дослідженням ізолятів *F.tularensis*, виділених на території України.

За допомогою методів ПЛР, рестрикційного аналізу, молекулярного клонування, афінної хроматографії, вестерн-блотингу та непрямого ІФА було отримано і випробувано три рекомбінантних протеїни: GroEl, SucB та FTT0975, що рекомендовані для використання у якості антигенів при проведенні непрямого ІФА з сироватками від диких кабанів та людей щодо наявності антитуляремійних антитіл.

Найбільш виражений сигнал із позитивними сироватками крові від свиней щодо *F. tularensis* subsp. *holarctica* був виявлений у протеїна GroEl: максимальна оптична густина при проведенні ІФА з цим антигеном досягала  $2,424 \pm 0,005$  при тестуванні сироваток крові від свиней, та  $1,266 \pm 0,002$  при

тестуванні сироваток крові від людей. При проведенні ІФА з протеїном SucB у якості антигену максимальна оптична густина досягала  $2,006 \pm 0,009$  та  $1,517 \pm 0,012$  при тестуванні сироваток крові від свиней та людей, відповідно. При використанні протеїну FTT0975 у якості антигену в ІФА максимальна оптична густина досягала  $2,535 \pm 0,05$  при тестуванні сироваток крові від свиней та  $1,784 \pm 0,006$  при тестуванні сироваток крові людей. Значення внутрішньосистемних коефіцієнтів варіативності не перевищували допустимі 10% (у рамках від 0,252% до 3,785%, в середньому 1,801%). Значення міжсистемних коефіцієнтів варіативності не перевищували допустимі 15% (у рамках від 0,947% до 2,630%, в середньому 1,811%), що підтверджує достовірність отриманих результатів

Протеїн GroE1 рекомендується використовувати в концентрації 1,04 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:400 від свиней та 1:100 від людей як антиген при проведенні непрямого ІФА для загальнородової диференціації антитіл до *F. tularensis*. Протеїн SucB також може використовуватись для загальнородової диференціації антитіл до збудника туляремії у концентрації 1,37 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:100 як від свиней, так і від людей. Чутливість обох методів становить 100%, специфічність 75,5% для ІФА, заснованого на протеїні SucB і 75% для ІФА, заснованого на протеїні GroE1, підтверджено їх антигенні властивості при дослідженні сироваток від людей.

За допомогою методів ПЛР і молекулярного клонування було отримано і випробувано рекомбінантний плазмідний позитивний контроль pTZ57F\_R\_FTFR зі вставкою ділянки гену *tul4* *F.tularensis* довжиною 103 п.н. Доведена можливість використання плазмідного контролю в якості позитивного контрольного зразку для визначення генетичного матеріалу

збудника туляремії у класичній ПЛР та ПЛР у реальному часі з аналітичною чутливістю реакції – одна копія в мікролітрі.

Вдосконалена та відпрацьована методика проведення кІФА на основі ліпополісахаридного антигену вакцинного штаму *F.tularensis* subsps. *holarctica* і гібридомних антитіл FF27/1/7/POD, за допомогою якої був проведений серомоніторинг диких кабанів України щодо туляремії. Позитивні сироватки були підтверджені методикою вестерн-блотингу. Було виявлено 86 (12,3 %) серопозитивних тварин з 701 дослідженої. Основна кількість позитивних зразків припала на Чернівецьку (50 %) та Хмельницьку (41,2 %) області. Також, не підтверджені у вестерн-блотингу сироватки були досліджені на бруцельоз, з яких 141 були позитивні (20 %).

Вдосконалена методика виділення генетичного матеріалу збудника туляремії із хвостів мишовидних гризунів на основі афінної сорбції для проведення скринінгу зразків від гризунів у ПЛР та ПЛР у реальному часі з огляду на причини біобезпеки. Встановлено, що ця методика є адекватною заміною стандартного дослідження органів у випадку, якщо розтин тварини з будь-якої причини неможливий. За використанням праймерної системи *Fran16S* було проведено скринінг генетичного матеріалу збудника туляремії в трьох областях України: в Харківській (n = 380), Дніпропетровській (n = 105) та Миколаївській (n = 501) був зібраний матеріал, потенційно заражений *F. tularensis*: кліщі (n = 216), хвости гризунів (n = 736), пелети (n = 25), сіно (n = 2), вода (n = 7).

У Харківській області було зібрано 380 зразків (183 хвости гризунів, 181 кліщ, 15 пелет, 1 проба води), із яких 23% були позитивними щодо вмісту генетичного матеріалу *F. tularensis* (88 зразків): 19,2% (74 зразки) кліщів, 2,6% (10 зразків) хвостів гризунів, 1% (4 зразки) пелет сови сірої (*Strix aluco*). Зразки

були зібрані у м. Харків (53 проби), Валківському (52 проби), Харківському (16 проб), Балаклійському (45 проб), Дергачівському (55 проби), Зміївському (61 пробу), Краснокутському (41 проба), Печенізькому (4 проби) і Богодухівському районах (53 проби).

Позитивні результати були виявлені в селі Газове Богодухівського району (48 позитивних зразків); селі Рай-Оленівка Харківського району (10 позитивних зразків); с. Крейдянка Балаклійського району (10 позитивних зразків); НПП «Гомільшанські ліси» Зміївського району (15 позитивних зразків), харківському лісопарку (4 позитивних зразка) та селі Перекіп Валківського району (1 зразок).

У Дніпропетровській області було зібрано 105 зразків з двох районів: Петропавлівського (67 проб) та П'ятихатського району (38 проб). Лише два зразки (1,9%) показали позитивний результат у ПЛР: зразок хвоста від гризуна *Apodemus agrarius*, зібраний у П'ятихатському районі поблизу села Червона поляна, та зразок кліща *Dermacentor marginatus*, зібраний у Петропавлівському районі поблизу села Петропавлівка. Всього із 105 зразків було зібрано: хвостів гризунів (52 зразки), кліщів *Dermacentor marginatus* (35 зразків), пелет *Strix aluco* (10 зразків), води (6 зразків) та сіна (2 зразки).

У Миколаївській області було зібрано 501 зразок з території 7 районів: Вознесінський район (190 зразків), Вітовський район (106 зразків), Первомайський район (101 зразок), Снігурівський район (62 зразки), Кривоозерівський район (34 зразки), Очаківський район (4 зразки), Березнегуватський район (4 зразки).

У Миколаївській області були досліджені лише хвости гризунів та, за виключеннями, гомогенати органів (17 зразків із Вознесінського району, 43 зразки із Вітовського району і 4 зразки із Очаківського району). З усіх досліджених зразків лише 2 продемонстрували позитивний результат (0,4%).

Позитивні зразки належали до видів *Sylviaemus sylvaticus* та *Mus musculus* і були зібрані у Вітовському районі, с. Зелений гай, та у Вознесенському районі, с. Баштанка, відповідно.

Був проведений аналіз відповідностей (correspondence analysis) всіх видів та типів зразків, який підтвердив, що під час дослідження найчастіше носіями *F. tularensis* були кліщі родини *Ixodidae*, а саме *D. reticulatus* та *I. ricinus*: 74,2% та 29,3% відповідно були позитивними.

За результатами MLVA-типуювання 20 ізолятів *F. tularensis*, встановлено, що всі вони належать до голарктичного підтипу. Ізоляти були розділені на три кластери. До європейського кластеру потрапила найбільша кількість ізолятів (14), що були виділені з усіх досліджених регіонів: Сумської, Чернігівської, Рівненської, Волинської, Львівської, Полтавської, Одеської, півострову Крим, Миколаївської, Запорізької, Вінницької (номера штамів 222, 86, 317, 138 \ 15, 201 (2 зразки), 205 \ 15, 103, 21, 128, 351 \ 278o, 359 \ 278o, 132, 66). Українські зразки, що потрапили до цього кластеру, мали 100% ідентичність між собою, та були споріднені до ізолятів з Польщі, Німеччини, Австрії, Франції, Швеції, Російської Федерації та Азербайджану. Українські штами відрізнялись від цих споріднених штамів кількістю тандемних повторів у локусі FT-M03. Вони мали 23 тандемних повтори, в той час як інші штами мали 10, 15, 16, 17, 18, 19 та 24 тандемних повтори.

Російсько-азербайджанський кластер включав 5 зразків, що були виділені з Криму, Запорізької, Сумської та Вінницької областей (штами № 456, 60, 37, 562 / 278o, 493). Зразки відрізнялись між собою замінами в локусах FT-M04 (3 та 4 тандемні повтори) і FT-M20 (3 та 4 тандемні повтори) та були найбільш споріднені до ізолятів із Росії та Азербайджану. Відмінності між російськими та українськими ізолятами були виявлені у локусі FT-M03 (16 тандемних повторів в українських зразках і 18 у російських). Відмінності між

азербайджанськими та українськими ізолятами були в локусах FT-M06 (4 повтори в українських ізолятах і 5 в азербайджанських) і FT-M03 (16 повторів в українських ізолятах і 17 в азербайджанських).

Зразок, що потрапив до чехословацького кластеру і був найбільш споріднений до ізолятів з колишньої Чехословачії та Польщі, був виявлений на Чернігівщині та включав штаб номер 523. Цей зразок відрізнявся від інших зразків, що також потрапили у цей кластер, 2 тандемними повторами у локусі FT-M06, замість 6 повторів.

Серед всіх генотипів найчастіше зустрічався генотип, пов'язаний з європейським кластером. Збудник цього генотипу був ізолюваний під час досліджень у 1996, 1998–2000, 2003, 2005, 2006, 2008, 2010, 2011 та 2016 роках серед всіх вищезазначених досліджених регіонів України.

Новизна роботи полягає у наступному. Вперше в Україні розроблені рекомбінантний позитивний контроль для ідентифікації генетичного матеріалу збудника туляремії, а також рекомбінантні антигени для ідентифікації антитіл до збудника туляремії у сироватках крові від тварин та людини.

Вперше на території України був проведений епізоотичний скринінг щодо наявності осередків туляремії з одночасним використанням молекулярно-генетичних та серологічних методів при дослідженні різноманітного польового матеріалу (сироватки диких кабанів, хвосту гризунів, кліщі та об'єкти середовища), що дало змогу визначити статус вже відомих осередків та виявити нові природні осередки туляремії.

Вперше проведено генотипування 20 українських ізолятів *F.tularensis* за 12 локусами, внаслідок чого визначені їх генотипи та спорідненість з іншими генетично подібними популяціями та висунуто ряд припущень щодо ймовірних шляхів циркуляції збудника на території України та за її межами.

Встановлено генотип, що превалював впродовж 10 років серед більшості областей України.

Результати розробок впроваджено в науково-дослідну роботу ННЦ «ІЕКВМ».

*Ключові слова:* імуноферментний аналіз, молекулярно-генетичний скринінг, полімеразна ланцюгова реакція, рекомбінантні антигени, рекомбінантний позитивний контроль, серомоніторинг, туляремія, MLVA.



## ANNOTATION

*Zlenko O.B.* Laboratory diagnostics of tularemia (enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction), epizootic monitoring and genotyping of the pathogen. - Qualified scientific work on the rights of the manuscript.

The thesis for a candidate of biological sciences degree in specialty 03.00.20 "Biotechnology". - National Scientific Center "Institute for Experimental and Clinical Veterinary Medicine", NAAS of Ukraine, Kharkiv, 2019.

The dissertation is devoted to the development of tularemia ELISA for the study of blood sera from boars and humans based on recombinant antigens, the development of positive control for detection *F.tularensis* in PCR in clinical and environmental specimens, providing the molecular-genetic and seroprevalence screening in Ukraine, as well as the phylogenetic study of *F.tularensis* isolated on the territory of Ukraine.

It has been obtained and tested three recombinant proteins: GroEl, SucB, and FTT0975 using PCR, restriction analysis, molecular cloning, affinity chromatography, Western blotting, and indirect ELISA. These proteins are recommended for use as antigens for the tularemia testing of human and swine sera by indirect ELISA.

The most pronounced signal with positive serum from pigs against *F. tularensis* subsp. *holarctica* was detected in the GroEl protein: the maximum optical density in ELISA with this antigen reached up to  $2,424 \pm 0,005$  when testing serum from pigs, and  $1,266 \pm 0,002$  when testing serum from humans. For the SucB antigen, the maximum optical density reached up to  $2,006 \pm 0,009$  and  $1,517 \pm 0,012$  when testing the blood sera from pigs and humans, respectively. When using the protein FTT0975 as an antigen in ELISA, the maximum optical density reached up

to  $2,535 \pm 0,05$  for pig sera and  $1,784 \pm 0,006$  for human sera. The values of intrasystem variability coefficients did not exceed the allowable 10% (in the range from 0,252% to 3,785%, on average 1,801%). The values of intersystem variability coefficients did not exceed the allowable 15% (in the range from 0.947% to 2.630%, on average 1.811%), which confirms the reliability of the results

The GroEl protein is recommended to be used in indirect ELISA at the 1,04  $\mu\text{g} / \text{ml}$  concentration and 1:400 swine serum dilution or 1:100 human serum dilution for the family differentiation of antibodies against *F. tularensis*. The FTT0975 protein is recommended for use in indirect ELISA to identify *F. tularensis* subtypes, at a concentration of 2,73  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and 1: 200 swine serum dilution or 1:50 human serum dilution. The SucB protein can also be used for the family differentiation of anti-tularemia antibodies at the concentration of 1,37  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and 1:100 swine and human serum dilution.

PCR and molecular cloning methods were used to obtain and test a recombinant plasmid positive control pTZ57F\_R\_FTFP with an insertion of the 103 bp *F.tularensis tul4* gene part. The possibility of using plasmid control as a positive control sample to determine the genetic material of the tularemia causative agent by conventional and qPCR with one copy/ $\mu\text{l}$  analytical reaction sensitivity was proved.

The technique of concurrent ELISA providing based on the lipopolysaccharide antigen of the LVS strain *F.tularensis* subsps. *holarctica* and hybridoma antibodies FF27 / 1/7 / POD was established. It was used for the tularemia seroprevalence monitoring among wild boars in Ukraine. Positive sera were confirmed by Western blotting. The 86 (12,3%) seropositive animals were identified from 701 studied. The majority of positive samples came from Chernivtsi (50 %) and Khmelnytsky (41,2%) rayons. Also, unconfirmed serum by Western blotting were tested for brucellosis, where 141 samples were positive (20%).

The technique of the tularemia pathogen genetic material extracting from rodent tails by the affine sorption method for further qPCR and PCR screening has been improved and refined for biosafety reasons. It has been established that this material is an adequate substitute for a standard examination of organs in cases when the animal autopsy is impossible for any reason. Using the Fran16S primer system, the screening of genetic material for the tularemia pathogen was provided in three oblasts of Ukraine: Kharkiv (n = 380), Dnipropetrovsk (n = 105) and Mykolaiv (n = 501). It was collected the material potentially infected with *F. tularensis*: ticks (n = 216), rodent tails (n = 736), pellets (n = 25), hay (n = 2), water (n = 7).

380 samples (183 rodent tails, 181 ticks, 15 pellets, 1 water sample) were collected in Kharkiv oblast, of which 23% were positive for the genetic material of *F. tularensis* (88 samples): 19,2% (74 samples) of ticks , 2,6% (10 specimens) of rodent tails, 1% (4 specimens) of owl pellets (*Strix aluco*). Samples were collected in city Kharkiv (53 samples) and rayons: Valky (52 samples), Kharkiv (16 samples), Balakliya (45 samples), Dergachy (55 samples), Zmyiv (61 samples), Krasnokutsk (41 samples), Pechenigy (4 samples) and Bohodukhiv (53 samples).

Positive results were found in the Gasove village, Bohodukhiv rayon (48 positive samples); Rai-Olenivka village in Kharkiv rayon (10 positive samples); Kreydianka village, Balakliya rayon (10 positive samples); National park “Homilshansky lisy” in Zmyiv rayon (15 positive samples), Kharkiv forest park (4 positive samples) and Perekip village in Valky rayon (1 sample).

In Dnipropetrovsk oblast, 105 samples were collected from two rayons: Petropavlovsk (67 samples) and Pyatikhatky (38 samples). Only two samples (1,9%) showed a positive result in PCR: the sample of rodent tail *Apodemus agrarius*, collected in the Pyatikhatky rayon near the Krasnaya Polyana village, and the tick sample *Dermacentor marginatus*, collected in the Petropavlovsk rayon near the Petropavlivka village. From 105 samples it were collected: rodent tails (52 samples),

*Dermacentor marginatus* ticks (35 samples), *Strix aluco* pellets (10 samples), water (6 samples) and hay (2 samples).

In the Mykolayiv oblast 501 samples were collected from the territory of 7 rayons: Voznesinsk (190 samples), Vitovsk (106 samples), Pervomaisk (101 samples), Snihuri (62 samples), Kryvoozerivsk (34 samples), Ochakiv (4 samples), Berezneguvate (4 samples).

In Mykolaiv oblast, only rodent tails and, rarely, homogenates of organs were investigated (17 samples from Voznesinsk rayon, 43 samples from Vitovsk rayon and 4 samples from Ochakiv rayon). Of all tested samples, only 2 showed a positive result (0,4%). Positive specimens belonged to the species *Sylvaemus sylvaticus* and *Mus musculus*, and were collected in the Vitovsk rayon, Zelena polyana village and in the Voznesinsk region, Bashtanka village, respectively.

A correspondence analysis of all specimen types was performed. It was confirmed that the most common carriers of *F. tularensis* in our study were the ticks of the family *Ixodidae*: *D. reticulatus* and *I. ricinus*: 74,2% and 29,3% respectively were positive.

According to the results of 20 *F. tularensis* isolates MLVA-typing, all of them were found to belong the *holarctica* subtype. The isolates were divided into three clusters. The largest number of specimens (14) were allocated to the European cluster, which were isolated from all studied oblasts: Sumy, Chernihiv, Rivne, Volyn, Lviv, Poltava, Odessa, Crimea, Mykolaiv, Zaporizhia, Vinnytsa (numbers of strains 222, 86, 317, 138 \ 15, 201 (2 specimens), 205 \ 15, 103, 21, 128, 351 \ 278o, 359 \ 278o, 132, 66). The Ukrainian specimens that were included in this cluster were 100% identical to each other and were related to specimens from Poland, Germany, Austria, France, Sweden, the Russian Federation and Azerbaijan. The Ukrainian strains differed from these related strains by the number of tandem repeats

at the FT-M03 locus. They had 23 tandem repeats, while other strains had 10, 15, 16, 17, 18, 19 and 24 tandem repeats.

The Russian-Azerbaijani cluster included 5 specimens isolated from Crimea, Zaporizhia, Sumy and Vinnytsia oblasts (strains 456, 60, 37, 562 / 278o, 493). The samples differed from each other at the FT-M04 loci (3 and 4 tandem repeats) and FT-M20 (3 and 4 tandem repeats) and were most closely related to specimens from Russia and Azerbaijan. Differences between Russian and Ukrainian samples were detected at the FT-M03 locus (16 tandem repeats in Ukrainian samples and 18 in Russian samples). Differences between Azerbaijani and Ukrainian samples were at loci FT-M06 (4 repeats in Ukrainian samples and 5 in Azerbaijani) and FTM03 (16 repeats in Ukrainian samples and 17 in Azerbaijani ones).

The sample that came to the Czech-Slovak cluster and was most closely related to the samples from the former Czechoslovakia and Poland, was found in Chernihiv and included strain number 523. This sample differed from other samples also included in this cluster by 2 tandem repeats at the locus FT-M06, instead of 6 reps.

Among all genotypes, the most common genotype was associated with the European cluster. This genotype was isolated during studies in 1996, 1998–2000, 2003, 2005, 2006, 2008, 2010, 2011 and 2016 among all regions of Ukraine, included in this study.

The novelty of the work is as follows. For the first time in Ukraine, a recombinant positive control has been developed to identify the genetic material of the causative agent of tularemia, as well as recombinant antigens to identify anti-tularemia antibodies in blood sera from animals and humans.

For the first time in Ukraine, epizootic screening was conducted for the presence of tularemia foci using the molecular genetic and serological methods at the same time, with a variety of field material (wild boar sera, rodent tails, ticks and

environmental objects), which allowed to study natural foci of tularemia and determine the status of already known foci.

For the first time, genotyping of 20 Ukrainian *F.tularensis* isolates was provided for 12 loci. It resulted in the identification of isolate genotypes and affinity with other genetically similar populations. It was concluded a number of assumptions about the likely pathways of strain circulation on the territory of Ukraine and beyond. It is identified one genotype that has been crossing over most of Ukraine oblasts during 10 years.

The results of the developments were implemented in the research work of NSC “IECVM”.

Keywords: ELISA, MLVA, molecular genetic screening, polymerase chain reaction, recombinant antigens, recombinant positive control, seroprevalence, tularemia

*Список публікацій здобувача*

1. Zlenko O.B., Gerilovych A.P. Development of recombinant positive control for *Francisella tularensis* detection by qPCR / *Biotechnologia Acta*. 2018. Vol. 11, No 4. P. 68-72 (Особистий внесок – брала участь в плануванні, проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

2. Genotyping of *Francisella tularensis* isolates from Ukraine / Zlenko O. B., Durr A., Schwarz J., Vydaiko N. B., Gerilovych A. P. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2018. Vol. 4, No 4. P. 12-15 (Особистий внесок – брала участь в плануванні, проведенні досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті)

3. PCR based prevalence study of *Francisella tularensis* in Kharkiv, Dnipropetrovsk, and Mykolaiv oblasts during 2015–2018 / Zlenko O. B., Tkach G. E., Sukhorukova A.B., Kylypko L.V., Machota L. S., Ignatenkov O. S.,

Vinokurova K. V., Shamychkova G. R., Shtepa O. P., Rezvykh V. G., Schwarz J., Duerr A., Popp C., von Buttlar H., Wolfel R., Solodiankin O.S., Gerilovych A. P. *J Vet Res.* 2020. Vol. 64, No 1. P. 63-71 (Особистий внесок – брала участь в плануванні, зборі польових щразків та лабораторному проведенні досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті)

4. Development of recombinant antigen-based ELISA for the detection of anti-tularemia antibodies in swine and human sera: a pilot study / Zlenko O. B., Popp C., von Buttlar H., Gerilovych A. P., Schwarz J. *Biotechnologia Acta.* 2020. Vol. 13, No 1. P. 45-55 (Особистий внесок – брала участь в плануванні, проведенні досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті)

5. Case report on the human infection with tularemia in Mykolaiv region, 2018 / Zlenko O.B., Ignatenkov O.S., Vinokurova K.V., Gerilovych A.P. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety.* 2020. Vol. 6, No 1. P. 15-17

6. Аналіз біологічних ризиків поширення туляремії у природних осередках у східних регіонах України / Болотін В. І., Стегній Б. Т., Солодянкін О. С., Зленко О. Б., Герілович А. П. *Ветеринарна медицина.* 2016. № 102. С. 30–33. (Особистий внесок – брала участь в узагальненні результатів та підготовці статті)

7. Рекомбінантний контрольний зразок для виявлення ДНК збудника туляремії методом полімеразної ланцюгової реакції pTZ57R/T\_FTFP : пат. 135803 Україна : МПК С12N 15/00, С12N 15/63 (2006.01). № u201811113; заявл. 12.11.2018; опубл. 25.07.2019, Бюл. №14/2019

8. Тест-система для виявлення ДНК збудника туляремії за допомогою полімеразної ланцюгової реакції "Tul-DNA-test": пат. 133254 Україна : МПК С12N 15/31 (2006.01), С12Q 1/6806 (2018.01), С12R 1/00. № u201811130; заявл. 12.11.2018; опубл. 25.03.2019, Бюл. № 6/2019

9. Спосіб отримання рекомбінантних антигенів GroElFTT, FTT0975, SucBFTT для діагностики туляремії за допомогою ІФА: пат. 143739 Україна : МПК (2006): C12N 15/00, C12N 15/70 (2006.01); заявл. 21.02.2020; опубл. 10.08.2020, Бюл. № 15/2020
10. Нові дані з приводу розповсюдження *F.tularensis* серед диких кабанів та домашніх свиней в Україні. *СВЕР Ukraine Regional One Health Research Symposium*, Київ, 24-28 квітня, 2017
11. Розробка рекомбінантного позитивного контролю для виявлення *Francisella tularensis* методом ПЛР у режимі реального часу. *3rd Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium*, Київ, 16-20 квітня, 2018
12. MLVA analysis of *Francisella tularensis* samples collected on the territory of Ukraine from 1997 to 2016. *European Meeting on Animal Chlamydiosis (EMAC-5)*, Одеса, 3-5 жовтня, 2018
13. Seroprevalence of *Francisella tularensis* among wild boars in Ukraine. *16th Medical Biodefence Conference*, Мюнхен, 28-31 жовтня, 2018
14. Розповсюдження туляремії як природно-опосередкованої інфекції. *Інфекційні хвороби в практиці лікаря-інтерніста: сучасні аспекти*, Суми, 30-31 травня 2018 р.
15. Case report on the human infection with tularemia in Mykolaiv region, 2018. *4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium*, Київ, 20-24 травня, 2019
16. Дослідження зразків від гризунів, кліщів та середовища щодо наявності генетичного матеріалу *F.tularensis* у Харківській області. *Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека*, Київ, 10-11 жовтня, 2019



17. Development of recombinant antigens for the diagnosis of tularemia.  
*Biosafety and Biosecurity symposium. One health – one vision*, Тбілісі, 20-21  
листопада, 2019

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	22
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	31
1.1. Загальна характеристика збудника туляремії	31
1.2. Таксономічне положення <i>F.tularensis</i>	33
1.3 Генетичні та ліпополісахаридні властивості збудника туляремії	35
1.4. Епідеміологія та епізоотологія збудника туляремії	36
1.4.1. Основні епідемічні чинники розповсюдження туляремії	36
1.4.1.1. Векторна передача туляремії	36
1.4.1.2. Туляремія серед ссавців	39
1.4.2. Ситуація щодо туляремії у світі	41
1.4.3. Ситуація щодо туляремії в Україні	45
1.4.3.1. Захворюваність серед людей	45
1.4.3.2. Епізоотичний стан	45
1.5. Методи лабораторної діагностики туляремії	47
1.5.1. Культивування збудника туляремії	48
1.5.2. Серологічні методи дослідження збудника туляремії	50
1.5.3. Дослідження збудника туляремії методом полімеразної ланцюгової реакції	54
1.5.4. Генотипування збудника туляремії	56
1.6. Висновок з огляду літератури	58
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	61
2.1. Матеріали для проведення досліджень	61
2.1.1. Вакцинний штам	61
2.1.2. Матеріали для культивування вакцинного штаму	61
2.1.3. Зразки ДНК-лізатів	62

2.1.4. Матеріали для проведення MLVA-генотипування	62
2.1.5. Зразки для дослідження серологічними та молекулярно-генетичними методами	63
2.1.6. Позитивні сироватки та негативні сироватки, використані для проведення серологічних досліджень	64
2.1.7. Матеріали для проведення кІФА та непрямого ІФА	64
2.1.8. Матеріали для проведення вертикального електрофорезу	66
2.1.9. Матеріали для проведення вестерн-блотингу	66
2.1.10. Матеріали для екстракції нуклеїнових кислот	67
2.1.11. Матеріали для проведення ампліфікації	68
2.1.12. Матеріали для проведення горизонтального електрофорезу	69
2.1.13. Матеріали для молекулярного клонування рекомбінантного позитивного контролю	69
2.1.14. Матеріали для молекулярного клонування рекомбінантних антигенів	70
2.1.15. Праймерні системи, використані під час проведення досліджень	70
2.1.16. Матеріали для культивування гібридомних клітин	72
2.1.17. Матеріали для проведення хроматографічної очистки антигенів та антитіл	72
2.1.18. Програмне забезпечення	73
2.2. Методи проведення досліджень	74
2.2.1. Культивування вакцинного штаму <i>F.tularensis</i> 15Г	74
2.2.2. Методика проведення MLVA-генотипування	74
2.2.3. Методи збору та транспортування зразків для досліджень	75
2.2.4. Методика проведення конкурентного ІФА з використанням ліпополісахаридних антигенів	76
2.2.5. Методика проведення непрямого ІФА з використанням рекомбінантних	

антигенів	77
2.2.6. Методика проведення Вестерн-блотингу	80
2.2.7. Методи екстракції нуклеїнових кислот	81
2.2.8. Методи ампліфікації нуклеїнових кислот	83
2.2.9. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР	86
2.2.10. Методика створення рекомбінантного позитивного контролю	87
2.2.11. Методика створення рекомбінантних антигенів	88
2.2.12. Методика пересіву гібридомних культур та напрацювання антитіл FF27/1/7/POD	90
2.2.13. Методика хроматографічної очистки рекомбінантних білків та гібридомних антитіл	91
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	94
3.1. Отримання рекомбінантних антигенів для виявлення антитіл до збудника туляремії у сироватках крові свиней і людини	94
3.2. Розробка рекомбінантного позитивного контролю для виявлення генетичного матеріалу збудника туляремії	112
3.3. Проведення скринінгових досліджень щодо місцезнаходження можливих природних осередків туляремії	118
3.3.1. Дослідження сироваток крові від диких кабанів щодо наявності антитіл до <i>F.tularensis</i> та <i>Brucella sp.</i>	118
3.3.2. Дослідження зразків від гризунів, кліщів та об'єктів довкілля щодо наявності генетичного матеріалу <i>F.tularensis</i> у Харківській, Миколаївській та Дніпропетровській областях	123
3.4. MLVA-генотипування ізолятів <i>F.tularensis</i> , виділених на території України впродовж 1997-2016 рр.	133
РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	140
ВИСНОВКИ	156

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

159

ДОДАТКИ

175

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- АПС – амонія персульфат
- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я
- ВРХ – велика рогата худоба
- ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
- дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфат
- ДТТ - дитіотреїтол
- ІМБ – Інститут мікробіології Бундесверу
- ІФА – імуноферментний аналіз
- кІФА – конкурентний імуноферментний аналіз
- ЛПС - ліпополісахариди
- МЕБ – Міжнародне Епізоотичне Бюро
- ПААГ – поліакриламідний гель
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
- п.н. – пари нуклеотидних залишків
- РА – реакція аглютинації
- РНК – рибонуклеїнова кислота
- СДС – додецилсульфат натрію (sodium dodecylsulfate)
- ТМВ - 3,3',5,5'-тетраметилбензидін
- УФ – ультрафіолет
- ФБС – фетальна бичача сироватка
- ФСБ – фосфатно-сольовий буфер
- canSNP - canonical single-nucleotide polymorphism (канонічний  
однонуклеотидний поліморфізм)
- CDC – Centers for Disease Control (Центр з контролювання захворювань)
- CV - coefficient of variation (коефіцієнт варіативності)
- ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay (імуноферментний аналіз)

HEPES - буферний агент цвіттеріонової сульфопонової кислоти

HRP – horse-radish peroxidase (пероксидаза хрину)

IPTG - Ізопропіл- $\beta$ -D-1-тіоґалактопіранозид

LVS – live vaccine strain (живий вакцинний штаи)

MLVA – multi-locus variable number tandem repeat analysis (мультилокусний аналіз варіабельних тандеиних повторів)

NaPy – піруват натрію

NEAA - заиінні амінокислоти

PCR – polymerase chain reaction (полімеразна ланцюгова реакція)

RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA (рандомна ампліфікація поліморфної ДНК)

Rep-PCR - repetitive element palindromic PCR (ПЛР повторюваних паліндромних елементів)

RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium (поживне середовище Інституту пам'яті Розвелл Парк)

TEMED - Тетраметилетилендіамін

TLR – toll-like receptors (толл-подібні рецептори)

VNTR – variational number tandem repeat (варіабельні тандеині повтори)

X-Gal - 5-бромо-4-хлоро-3-індоліл- $\beta$ -D-ґалактопіранозид

## В С Т У П

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Туляремія - це зоонозна інфекція, що викликається грам-негативною, неспоровою бактерією *Francisella tularensis*. Це захворювання є ендемічним у більшості європейських країн. Природні осередки туляремії є дуже стійкими, вони можуть існувати століттями, проявляючи себе періодичними спалахами захворювань серед гризунів і епідеміями серед людей. У деяких країнах існують ендемічні регіони, де виникають спалахи захворювання, поряд з регіонами, де туляремія ніколи не виникала. У ендемічній зоні туляремія може виникати щорічно чи з перервою у десятиріччя. Особливої уваги слід приділяти збуднику туляремії також через те, що він може бути використаний як біологічна зброя. Так само туляремія відноситься до розряду професійних ризиків для працівників сільського та лісного господарств [1]- [3].

В Україні епідемічна та епізоотична ситуація в різні роки була неоднаковою і залежала від соціально-економічних умов, рівня діагностики, якості проведення відповідних заходів та координації дій фахівців медичної та ветеринарної служб. Було встановлено, що під час збройних конфліктів у Косово, Боснії та Герцеговині, а також за часів Другої світової війни відмічалася значна кількість спалахів туляремії внаслідок загального погіршення рівня гігієни населення і санітарних умов. Тому, для України ця проблема набуває особливої актуальності через проведення бойових дій на сході України, адже великі території наразі є неконтрольованими.

Зважаючи на те, що наразі бракує вітчизняних тест-систем для ідентифікації збудника туляремії, розробка та вдосконалення методів діагностики на основі полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу є безумовно перспективним напрямом досліджень.



**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційна робота виконувалася впродовж 2015-2020 рр. згідно з аспірантським планом наукових досліджень ННЦ «ІЕКВМ», затвердженим Національною академією наук України, та у рамках завдання 38.01.01.02 Ф «Встановити видо- та родоспецифічні генетичні маркери збудників емерджентних інфекційних захворювань ВРХ, свиней, птиці та розробити методологію їх моніторингу і діагностики на основі молекулярно-генетичних технологій» (2016-2019 рр., номер держреєстрації 0116U000237), а також за підтримки Інституту Мікробіології Бундесверу та GIZ GmbH у рамках проекту «Україно-німецька ініціатива «Біологічна безпека для управління ризиками зоонозів на територіях, які розташовані біля зовнішніх кордонів країн-членів Європейського союзу» (2016-2019 рр., номер держреєстрації 16.9072.6-007.04.)

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи полягала у розробленні і вдосконаленні засобів діагностики туляремії на основі полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу, проведенні молекулярно-генетичного скринінгу і серомоніторингу щодо поширення туляремії, а також аналізу генетичних маркерів мінливості ізолятів *F.tularensis*, виділених на території України.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

- сконструювати і отримати рекомбінантні антигени на основі білків GroE1, SucB та FTT0975 для ідентифікації антитіл до збудника туляремії методом ІФА.

- сконструювати і отримати рекомбінантний позитивний контрольний зразок гена *tul4* *F. tularensis* для діагностики збудника туляремії методом ПЛР у реальному часі.

- дослідити епізоотичну ситуацію з туляремії на території України молекулярно-генетичними і серологічними методами.

- проаналізувати генетичні маркери мінливості культур *F. tularensis*, виділених на території України у 1996-2016 рр.

*Об'єкт дослідження:* туляремія та її лабораторна діагностика.

*Предмет дослідження:* геном та антигенні детермінанти *F. tularensis*, біологічні, молекулярно-генетичні та філогеографічні особливості збудника туляремії, конструювання рекомбінантних антигенів та плазмідних контролів для серологічної та молекулярної діагностики туляремії, MLVA-типуювання збудника *F. tularensis*.

*Методи дослідження:* Робота виконана з використанням молекулярно-генетичних (ПЛР, MLVA-типуювання, секвенування), молекулярно-біотехнологічних (генна інженерія, хроматографія), клітинних (культивування гібридом), серологічних (ІФА, вестерн-блотинг), філогенетичних (MLVA-типуювання і кластеризація), біоінформатичних, у т.ч. математико-статистичних методів досліджень (аналіз нуклеотидних послідовностей, аналіз відповідностей, метод невваженого попарного середнього, стандартне відхилення, коефіцієнт варіативності).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше в Україні розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантних антигенів на основі протеїнів GroEl, SucB, FTT0975 для ідентифікації антитіл проти збудника туляремії у сироватках крові від свиней та людини методом ІФА, а також розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантного позитивного контролю для ідентифікації генетичного матеріалу *F.tularensis* методом ПЛР. Новизна зазначених розробок підтверджена 3 патентами України на корисну модель.

Вперше на території України був проведений серомоніторинг щодо туляремійної інфекції серед диких кабанів (*Sus scrofa*), у ході якого було встановлено циркуляцію *F.tularensis* серед диких кабанів на територіях Хмельницької, Чернігівської, Харківської, Сумської та інших областей України.

Отримані нові дані з епізоотологічного стану щодо туляремії на територіях Харківської, Дніпропетровської і Миколаївської областей у результаті проведення епізоотичного скринінгу щодо наявності осередків туляремії з використанням молекулярно-генетичних методів і з відбором різноманітного польового матеріалу (зразки від гризунів, кліщі та об'єкти середовища). Було підтверджено циркуляцію *F.tularensis* на територіях Харківської, Дніпропетровської і Миколаївської областей. Встановлено, що частота виявлення генетичного матеріалу *F. tularensis* найвища серед зразків кліщів родини *Ixodidae*.

Вперше при використанні методу MLVA проведено генотипування 20 українських ізолятів *F.tularensis* за 12 локусами, внаслідок чого визначені їх генотипи та спорідненість з іншими генетично подібними популяціями та висунуто ряд припущень щодо ймовірних шляхів їх циркуляції на території України та за її межами. Встановлено генотип *F.tularensis*, що був віднесений до «європейського» кластеру, який превалював впродовж 10 років у більшості областей України.

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати досліджень використано для розробки нормативної документації щодо способу отримання рекомбінантних протеїнів, деклараційний патент України на корисну модель № UA 143739 «Спосіб отримання рекомбінантних антигенів GroElFTT, FTT0975, SusBFTT для діагностики туляремії за допомогою ІФА» (додаток А), а також виготовлення, контролювання та застосування ПЛР-тест-системи з

рекомбінантним позитивним контролем для виявлення ДНК збудника туляремії, деклараційний патент України на корисну модель № UA 135803 «Рекомбінантний контрольний зразок для виявлення ДНК збудника туляремії методом полімеразної ланцюгової реакції pTZ57R/T\_FTFP» (додаток Б) і №UA 133254 «Тест-система для виявлення ДНК збудника туляремії за допомогою полімеразної ланцюгової реакції "Tul-DNA-test"» (додаток В).

Розроблені «Методичні рекомендації щодо лабораторної діагностики туляремії методами полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу», розглянуті та схвалені методкомісією ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 6.11.2019 р., та затверджені Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 1 від 11.04.2020 р.).

Розроблені та вдосконалені методики серологічного (ІФА, вестерн-блотинг) та генетичного (ПЛР) досліджень на туляремію клінічних зразків та зразків середовища, що рекомендовані до використання у роботі спеціалістами медицини та ветеринарії.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом особисто проведено основний обсяг пошукових, аналітичних та експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів, статистична обробка даних, формулювання висновків і практичних пропозицій, а також оформлення рукопису. Отримання рекомбінантних протеїнів та MLVA-генотипування були здійснені за участю доктора Юлії Шварц на базі Інституту мікробіології Бундесверу (Німеччина). Серологічні дослідження (конкурентний ІФА та вестерн-блотинг) були проведені за протоколом Інституту мікробіології Бундесверу та оптимізовані для роботи в ННЦ «ІЕКВМ» особисто здобувачем. Збір польового матеріалу для епізоотичного скринінгу проведено здобувачем сумісно з головним ентомологом Г.Є. Ткачем (ДУ «Харківський обласний

лабораторний центр»). Частина матеріалу для досліджень було люб'язно надано завідуючою лабораторією особливо небезпечних інфекцій Винокуровою К. В. (ДУ «Миколаївський обласний лабораторний центр»), головним лікарем-епідеміологом Дніпропетровської області Шамичковою Г. Р. (ДУ «Дніпропетровський обласний лабораторний центр»), заступником директора з наукової роботи Інституту ветеринарної медицини НААН, доктором вет.наук Ситюком М. П. та завідуючою референс-лабораторією з дослідження особливо небезпечних патогенів Центру громадського здоров'я МОЗ України Наталією Видайко. Молекулярно-генетичні дослідження проведені на базі ННЦ «ІЕКВМ» особисто здобувачем з використанням власних розробок. Опрацювання результатів, їх аналіз та трактування проведені пошукувачем особисто.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати були представлені, обговорені та схвалені на звітних сесіях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» у 2015-2019 рр., а також на наступних наукових конференціях:

- Міжнародній науково-практичній конференції «Транскордонні емерджентні хвороби тварин (африканська чума свиней, нодулярний дерматит ВРХ, грип птиці, блютанг, бруцельоз та ін.): актуальні аспекти біологічної безпеки та контролю» (м. Одеса, 2017р.),
- 2-му Всеукраїнському дослідницькому симпозіумі «Єдине здоров'я» (м. Київ, 2017);
- 3-му Всеукраїнському дослідницькому симпозіумі «Єдине здоров'я» (м. Київ, 2018);
- 5-му Європейському симпозіумі з приводу хламідіозу тварин (EMAC-5) (Одеса, 2018);
- 16-й конференції з медичинської біобезпеки (м. Мюнхен, 2018);

- Всеукраїнській науково-практичній конференції «Інфекційні хвороби в практиці лікаря-інтерніста: сучасні аспекти» (м. Суми, 2018 );
- 4-му Всеукраїнському дослідницькому симпозиумі «Єдине здоров'я» (м. Київ, 2019).
- Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека (м. Київ, 2019).
- Симпозиумі з біобезпеки і біозахисту «One health – one vision», (м. Тбілісі, 2019)

**Публікації.** За темою дисертаційної роботи опубліковано 17 наукових праць, з яких 5 – у фахових виданнях, перелік яких затверджено МОН України, одна з фахових – за кордоном (Scopus), та опис трьох патентів України на корисну модель.

**Структура та обсяг дисертації.** Основний зміст дисертації викладено на 131 сторінці комп'ютерного тексту та ілюстровано 12 таблицями і 32 рисунками. Робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів та їх обговорення, висновків, списку джерел літератури, який містить 130 найменувань, та додатків.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Загальна характеристика збудника туляремії

Туляремія - це зоонозна природно-осередкова інфекція, що викликається грам-негативною, неспоровою, факультативно-внутрішньоклітинною бактерією *Francisella tularensis*. *F.tularensis* є облигатним аеробом з оптимальною температурою культивування 37°C, що потребує додавання цистеїну до поживних середовищ. Природні резервуари інфекції - зайцеподібні (зайці та кролі) та гризуни: миша хатня (*Mus musculus*), жовтогруда (*Sylvaemus tauricus*) та лісова (*Sylvaemus sylvaticus*), полівка руда (*Myodes glareolus*), нориця водяна (*Arvicola amphibius*), ондатра (*Ondatra zibethicus*) та інші. Особливо активним джерелом збудника у туляремійних вогнищах, окрім зайців, є звичайні сірі полівки (*Microtus arvalis*). Коти є носіями інфекції серед домашніх тварин. Загалом, на туляремію хворіють більше 100 видів тварин. Є два типи туляремійної інфекції (А і В), в Європі та Азії поширений тип В, що викликається бактерією *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. Цей підтип широко розповсюджений серед зайців та дрібних гризунів, є менш вірулентним та не ферментує гліцерол. Збудник туляремії може передаватися з 13 видами кліщів, що належать до 4 родів: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* та *Ixodes*, з яких для України найбільш ендемічно та епізоотично вагомими є кліщі роду *Dermacentor*. До того ж, крім векторної передачі, збудник туляремії може передаватись при контакті з інфікованими тваринами чи їх фомітами у навколишньому середовищі, а також через ковтання контамінованої води та при споживанні погано обробленого м'яса. Тварини-носії, інфікуючи виділеннями воду, побутові речі, харчові продукти, являють епізоотологічну

небезпеку для людини. Були описані два шляхи циркуляції туляремії в природі: «наземний» та «водний». При «наземній» циркуляції, *F.tularensis* репродукується в організмах гризунів і лагоморф. Передача захворювання здійснюється переважно членистоногими векторами. При «водній» циркуляції джерелами інфекції є бобри, ондатри та водяні щурі, в організмі яких збудник персистує протягом тривалого часу, а його передача до людей та сприйнятливих тварин відбувається через контаміновану воду. Передача туляремії від людини до людини не була описана [2], [4-7].

Туляремія характеризується розвитком гарячки і сепсису. При відсутності лікування, підвид *F.tularensis* subsp. *tularensis* може викликати значну смертність через рабдоміоліз та септичний шок. До появи антибіотиків рівень смертності від туляремії типу А становив (5–15)%, а в найбільш тяжких формах – (30–60)%. Насьогодні, при наявності лікування, смертність становить менше 2%. Підвищена температура супроводжується прогресуючою слабкістю, анорексією і втратою ваги. Респіраторні симптоми включають сухий кашель та біль у горлі, що можуть виникати незалежно від того, потрапила інфекція до організму інгаляційним шляхом чи ні. Шлунково-кишкові симптоми, такі як нудота, блювота і діарея, частіше зустрічаються при захворюванні на туляремію типу А, ніж типу В. В залежності від шляху інфікування і місця проникнення інфекції в організм, на місці проникнення збудника можуть формуватися виразки та абсцеси (переважно у людей) та запалення регіонарних лімфатичних вузлів. Найчастіше перебіг туляремії у людей відбувається за виразково-залозистим та виразковим типами. Також, зустрічаються орофарингіальна та очнозалозиста та рідше тифоїдна форми перебігу хвороби. Збудник активно розмножується в селезінці, печінці, кістковому мозку та легенях, звідки бактерія може бути виділена в культуру [2, 4, 3, 5, 6, 7, 8].



Для культивування *F.tularensis* необхідно використовувати спеціальні поживні середовища, такі як середовище FT, середовища Чапіна та Маккоя, що містять цистеїн. При цьому, через 48 годин інкубації за температури 37°C, утворюються дрібні та округлі колонії. Збудник туляремії відноситься до бактерій, що повільно зростають в культурі та надзвичайно складно виділяються з польових зразків, зокрема, наприклад, коефіцієнт виділення з трупів тварин досягає лише 30%. Тому, для ідентифікації *F.tularensis* найчастіше використовують методи виявлення геному збудника (полімеразна ланцюгова реакція) та антигенів чи антитіл до нього (РА, ІФА), результати яких у більшості випадків додатково підтверджують за допомогою Вестерн-блотингу [1 – 4], [9 – 16].

## 1.2. Таксономічне положення *F.tularensis*

*F.tularensis* була описана у 1911 році Д. Мак-Коем та Ч. Чапіним, і спочатку отримала назву *Bacterium tularensis* на честь американського міста Туларе, де вона була виділена з популяції місцевих гризунів. Протягом тривалого часу, збудника туляремії за серологічними реакціями відносили до роду *Pasteurella*, але у 1966 р. після проведення гібридизаційного генетичного аналізу, а пізніше, після проведення секвенування гену 16S РНК, було встановлено, що збудник туляремії близький до  $\gamma$ -субкласу протеобактерій, проте, він не може бути віднесений до жодного з нині відомих бактеріальних родів та сімейств, тому *Pasteurella tularensis* була перейменована у *Francisella tularensis* на честь видатного вченого Едварда Франціса [5]. *Francisella tularensis* не має близького філогенетичного споріднення з будь-якими людськими патогенами чи бактеріями нормальної флори. Загалом, збудник туляремії належить до групи внутрішньоклітинних бактерій, разом з бактеріями родів *Listeria*, *Legionella*, *Brucella*, *Coxiella* та *Rickettsia* [6].

Рід *Francisella* належить до родини *Francisellaceae* та містить 2 види: *Francisella tularensis* та *Francisella philomiragia*, що ідентичні на  $\geq 98,3\%$  за результатами секвенування гену 16S рРНК. Ця родина відрізняється унікальними фенотиповими характеристиками, такими як коккоїдна морфологія, грам-негативність, ріст на цистеїновому середовищі та особливий склад жирних кислот [5].

Найбільш спорідненою до родини *Francisellaceae* вважається родина *Piscirickettsiaceae*, до якої належить ряд бактерій-внутрішньоклітинних паразитів, таких як *Piscirickettsia salmonis*, що викликає септицемію у риби [5], а також *Wolbachia persica*, що є ендосимбіонтом кліщів [6].

Збудника туляремії розділяють на 5 підвидів: *F. tularensis tularensis* (тип А) – вискоковірулентний підвид, що найбільше розповсюджений на території Північної Америки, *F. tularensis holarctica* (тип Б) – підвид зі зниженою вірулентністю, що частіше зустрічається на території північної Європи та Азії. Ці два підвиди вважаються клінічно найбільш важливими. Інші три підвиди (*F. tularensis* subsp. *novicida*, subsp. *mediasiatica* та японський різновид *F. tularensis* subsp. *holarctica*) зустрічаються рідко і не призводять до формування епідемій чи епізоотій. Вакцинний штам (LVS) збудника туляремії - це атенуований варіант *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Другий вид роду *Francisella* - *F. philomiragia* – є патогеном ондатр (рис.1.1) [4], [6].

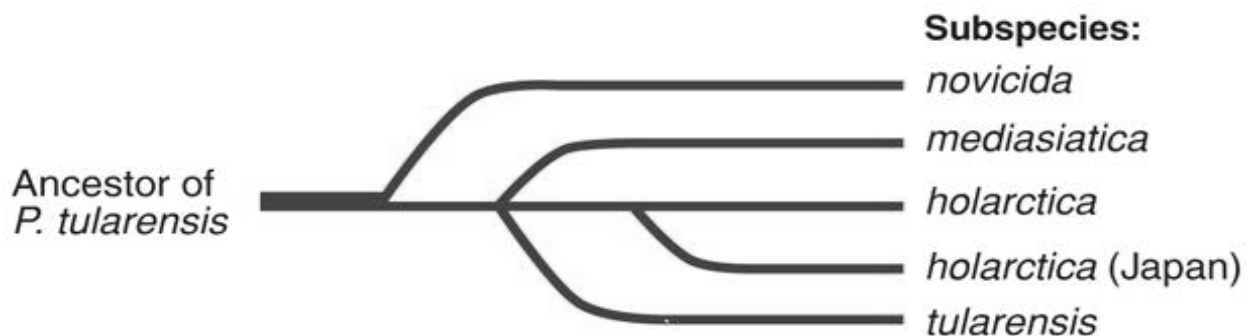


Рисунок 1.1. Схема еволюції підвидів збудника туляремії, заснована на різниці нуклеотидних послідовностей [6].

### 1.3. Генетичні властивості та характеристика ліпополісахаридів збудника туляремії

Наразі, вже відомі результати генетичних досліджень різних штамів *F. tularensis*, що включають повногеномне секвенування починаючи з 2005 р. [17]-[20]. Геном штаму *F. tularensis* subsp *tularensis* SCHU S4 складається з кільцевої хромосоми розміром 1892819 пар нуклеотидів. Загальний вміст G-C пар нуклеотидів складає 32,9%. За попередніми оцінками, геном *F. tularensis* subsp *tularensis* SCHU S4 містить 1804 кодуючі послідовності, включаючи псевдогени, вміст яких більше за 10%. В порівнянні, розмір геному *F. tularensis* subsp *holarctica* LVS становить 1895998 пар нуклеотидів із 1380 кодуючими генами. Низький вміст G-C пар є типовим для малих бактеріальних геномів (0,9–2,0) Mb. Всього, 1281 ген *F. tularensis* subsp *tularensis* SCHU S4 має гомологів серед різних  $\gamma$ -протеобактеріальних геномів [17], [21].

Підвиди *F. tularensis* мають високий ступень генетичної подібності (вище 97%). *F. tularensis* subsp *novicida* має найбільшу генетичну відмінність від всіх інших відомих підвидів. *F. tularensis* subsp *novicida* U112 має більший геном, що складається із 1910031 пар нуклеотидів, з більшою кількістю кодуючих генів (1731). Таку різницю у геномах пов'язують з тим, що бактерія *F. tularensis* subsp *novicida* більш стабільна при перебуванні поза клітинами організма-хазяїна, ніж інші підвиди *F. tularensis*. Але, незважаючи на це, при дослідженні методом ДНК-ДНК гібридизації, подібність *F. tularensis* subsp *novicida* до інших підвидів *F. tularensis* все ще досить висока і складає близько 92% [21, 22].

Ліпополісахариди (ЛПС, ендотоксин) є основними компонентами зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій. Вони здатні активувати сигнальні каскади імунної відповіді при взаємодії з Toll-подібними рецепторами на макрофагах, через що їх відносять до патоген-асоційованих

молекулярних патернів (ПАМП). Зазвичай, вони складаються з фосфорильованого гексаацильованого дисахариду глюкозаміну, що модифікується додаванням олігосахаридів, які утворюють О-антиген. Зміни в структурі ЛПС значно впливають на біоактивність ендотоксину. ЛПС *F. pgdutularensis* у 1000 разів менш потужний, ніж ЛПС ентеробактерій і не активує імунну відповідь через TLR4 [6].

ЛПС збудника туляремії має унікальні структурні особливості, які пояснюють його низьку біоактивність. Так, в структурі ЛПС *F. tularensis*, в порівнянні з *E.coli*, значно менше жирних кислот в положенні О-3 гексозаміну 2 ліпиду А, але вони дуже довгі. Центральна частина ЛПС містить 3-дезоксид-манно-октүлозонову кислоту та невелику кількість гептоз, в порівнянні з іншими бактеріями. Структура О-антигену *F. tularensis* subsp. *tularensis* і subsp. *holarctica* ідентична, але О-антиген *F. tularensis* subsp. *novicida* відрізняється. Генетичний кластер, що кодує О-антиген *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 містить елемент вставки (ISFtu1), що також присутній у *Shigella sonnei*. Ця вставка підвищує вірулентність бактерії [6], [9], [23] - [25].

## **1.4. Епідеміологія та епізоотологія збудника туляремії**

### **1.4.1 Основні епідемічні чинники розповсюдження туляремії**

#### **1.4.1.1. Векторна передача туляремії**

Вперше векторна передача туляремії була охарактеризована Едвардом Францісом у 1919 р., у зв'язку з чим хвороба отримала одну з назв «лихоманка оленячих мух». Кліщова передача туляремії була вперше описана у 1923 році у штаті Айдахо, а у 1924 році вченим Р. Паркером була виділена культура збудника туляремії із кліща *Dermacentor andersoni* [26]. Туляремія може передаватися між ссавцями широким спектром членистоногих, включаючи блох, вошей, мошок, клопів, кліщів, комарів та мух. Найважливішим

вектором, при цьому, вважаються «тверді» кліщі родів *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* і *Ixodes*. Мухи (*Chrysops spp.*) - найпоширеніші вектори в деяких штатах США. Декілька спалахів туляремії серед людей в штаті Юта були пов'язані з передачею бактерії мухами виду *Chrysops discalis*. На території колишнього Радянського Союзу було продемонстровано передачу бактерії комарами (*Aedes spp.*, *Culex spp.*, *Anopheles spp.*) і кліщами (*Ixodes spp.*) [7]. У Центральній Європі важливими векторами вважають кліщів *Dermacentor reticulatus* і *Ixodes ricinus*. У деяких районах Австрії та Чехії близько 2% кліщів *D. reticulatus* були позитивними щодо наявності *F. tularensis* [27].

Передача туляремії кліщами зазвичай призводить до спорадичних випадків, але інколи трапляються і масові спалахи [28]. Життєвий цикл більшості кліщів продовжується протягом двох років і включає в себе чотири стадії: яйце, личинка, німфа і імаго. Передача *F. tularensis* від личинки до імаго була продемонстрована *in vitro* для різних видів жорстких кліщів. Можливість трансваріальної передачі бактерії наразі під сумнівом, адже різні колективи вчених отримали суперечливі дані з цього приводу [26], [29], [30]. Було визначено, що бактерія *F. tularensis* локалізується у кишечнику та гемолімфі жорстких кліщів, а також може бути знайдена і в слинних залозах [30].

Серед декількох видів кліщів були виявлені ендосимбіонти, подібні *Francisella tularensis*. Gerhart J. G. та ін. показали на прикладі ендосимбіонтів кліща *Amblyomma maculatum*, що ендосимбіонти кліщів еволюційно походять від патогенних штамів туляремії ссавців [31]. Експерименти з *D. andersoni* та *D. variabilis* показали присутність ендосимбіонтів в репродуктивних тканинах кліщів та їх можливу присутність в гемолімфі і слинних залозах [26], [32]. В організмах лабораторних морських свинок, на яких жили інфіковані ендосимбіонтами *D. andersoni*, не було визначено формування імунної

відповіді та розвитку хвороби. Незважаючи на це, роль у патогенному процесі *Francisella tularensis*- подібних ендосимбіонтів досі не визначена, так як у них були виявлені гомологічні до *F.tularensis* гени *iglC* та *mglA*, що відіграють значущу роль в розвитку патологічного процесу туляремії. Вплив ендосимбіонтів на компетентність і передачу туляремії також не визначений [26], [31], [33].

Серед двокрилих найбільш значущими у передачі туляремії є родина *Tabanidae*, до якої відносяться справжні гедзі (*Tabanus spp.*, *Chrysozona spp.*) і оленячі мухи (*Chrysops spp.*). Ці комахи зустрічаються майже у всіх частинах світу, а жіночі особини всіх видів є гематофагами [26]. Передача збудника туляремії двокрилим особливо часто спостерігалась на територіях колишнього Радянського Союзу і США, де один з останніх спалахів, пов'язаних з мухами, відбувся у штаті Юта у 2007 р. [7], [34].

Передача *F. tularensis* до людини шляхом укусу табанід відбувається механічним способом. Оленячі мухи можуть харчуватись на багатьох господарях. У разі переривання харчування через будь-які обставини, наприклад при рухах тварини хвостом, муха перелітає на іншого господаря протягом короткого часу, чого достатньо для перенесення і ураження інших тварин туляремією. Однак, збудник туляремії не може знаходитись у табанідах впродовж тривалого часу. Едвард Франціс встановив, що табаніди можуть передавати *F. tularensis* тваринам тільки до 4 днів після початкового зараження. Так як передача туляремії табанідами вважається лише механічною, немає жодних даних про локалізацію патогена десь крім ротової порожнини мух [26].

Москіти, так як і мухи, механічно переносять збудника туляремії, імовірно, через ротовий апарат комарів. Досить багато (> 400 випадків) спалахів туляремії у світі пов'язують саме з передачею інфекції москітами,

особливо у випадках наявності відкритих водойм, контамінованих збудником туляремії [35-38]. Ризик інфікування також підвищується при механічному контакті з комарами, а саме їх скарифікації (втиранні) в шкіру та потраплянні екскрементів до ран сприйнятливих тварин чи людей, що вивільнюються під час годування москіта. Трансоваріальної передачі туляремії, чи розмноження бактерії всередині москітів не було виявлено. Тому москіти, як і мухи, не вважаються важливими у довготривалій циркуляції патогена в природі [26].

#### 1.4.1.2. Туляремія серед ссавців

Туляремія уражає широкий діапазон живих організмів, включаючи в основному види ссавців і, в меншій мірі, птахів, амфібій, риб і навіть безхребетних. Протягом тривалого часу зайцеподібних вважали головним природним резервуаром туляремії, чи «заячої лихоманки». В основному, туляремія передавалась до людини під час полювання та оброблення заячих тушок [7].

На території Нового Світу кролик (*Sylvilagus spp*), чорнохвостий джекбабіт (*Lepus californicus*) і заєць (*Lepus americanus*) мають важливе значення в екології туляремії. Європейський сірий заєць (*Lepus europaeus*), гірський заєць (*Lepus timidus*) і японський заєць (*Lepus brachyurus*) пов'язані з туляремією на території Старого Світу. Європейський дикий кролик (*Oryctolagus cuniculus*) і, разом з ним, домашній кролик обидва відносно стійкі до інфікування збудником туляремії [2], [39].

Також, спалахи туляремії були описані серед лугових собачок і споріднених до них бабаків, норок, ховрахів, бобрів, ондатр і, зокрема, мишовидних гризунів. Ці тварини, разом із лагоморфами, вважаються основними носіями збудника туляремії у дикій природі. Часто спалахи туляремії серед населення пов'язують з підвищенням чисельності гризунів, а

систематичні дослідження на території колишнього Радянського Союзу показали, що гризуни були основним джерелом цієї інфекції для людей. Зокрема, найбільш часто туляремію виявляли серед водяних щурів (*Arvicola terrestris*), звичайних бурозубок (*Microtus arvalis*) і хатніх мишей (*Mus musculus*). Фекалії гризунів можуть контамінувати збудником туляремії воду, сприяючи її розповсюдженню далі за «водним» типом [2], [7], [40].

Парнокопиті тварини – велика група ссавців, що також хворіють на туляремію, але їх роль у екології цієї інфекції вивчена дуже слабо. Так, наприклад, на туляремію можуть хворіти дикий кабан (*Sus scrofa*) і сарна європейська (*Capreolus capreolus*). Так, дослідження серопревалентності диких кабанів північно-східної частини Німеччини показало 3,1% заражених туляремією тварин. На території Чеської Республіки ці показники коливались від 3% до 17%, у часи масштабних спалахів туляремії в західній Моравії [41], [42]. Парнокопиті тварини, частіше за все, хворіють на туляремію безсимптомно, що дозволяє їм бути носіями інфекції протягом тривалого часу, чим вони різко відрізняються від зайцеподібних та гризунів. Деякі гризуни, особливо ті, що належать до першого класу чутливості до туляремії, як руда полівка (*Myodes glareolus*), помирають від інфекції протягом лічених днів [4], [15].

Роль домашніх тварин у екології туляремії також вивчена недостатньо. Відомі випадки інфікування збудником туляремії ВРХ та овець [43, 44]. Очевидно, що домашні свині також є важливим резервуаром інфекції, яку вони можуть отримати під час спарювання з дикими кабанями, укусах кліщів чи вживанні інфікованої води під час вільного випасу. Таким чином, туляремія є професійним захворюванням не тільки для мисливців, а і для працівників ферм [41].



Відомі випадки туляремії серед хижих тварин, включаючи домашніх котів та собак. Вважається, що коти та собаки зазвичай стійкі до хвороби, але існує достатньо клінічних випадків зараження цих домашніх тварин з явними симптомами та летальними випадками. Достовірно зафіксованих випадків передачі туляремії від домашніх котів та собак небагато. Частіше за все, передача туляремії до людини проходила через місце укусу, але є випадки зараження також і інгаляційним шляхом [45]-[49].

Хоча дослідження показують, що ссавці зберігають і виділяють бактерії в навколишнє середовище протягом достатньо тривалого часу, і досі тривають дискусії на тему того, чи вони є основним природним резервуаром для *F. tularensis*. Також, все ще не зрозуміло, які види відіграють більш значущу роль у зберіганні природних осередків туляремії та як саме впливають на її екологію. Моделі передачі туляремії можуть також змінюватися з часом. У Канаді, наприклад, контакт з кроликами був найчастішим способом поширення інфекції до 1950-х років, тоді як з недавніх пір водяні ондатри набули більшого значення [7].

#### **1.4.2. Ситуація щодо туляремії у світі**

Туляремію реєструють у багатьох країнах північної півкулі, хоча це і доволі рідкісне захворювання. На території південної півкулі випадків хвороби практично не зареєстровано (рис.1.2.).

В Австралії із рани на нозі людини був виділений ізолят *F. tularensis* subsp. *novicida*, але він не викликав типових клінічних проявів. У 2011 р. став відомим випадок захворювання людини на виразково-залозисту туляремію через укус кільцевохвостого посума (*Pseudocheirus peregrinus*), а в 2017 році від цих тварин був виділений японський ізолят *F. tularensis* subsp. *holarctica*.

Інфекція, спричинена цим вірусом, проявлялася у вигляді некротизуючих ентеритів чи гепатитів [7], [50]-[52].

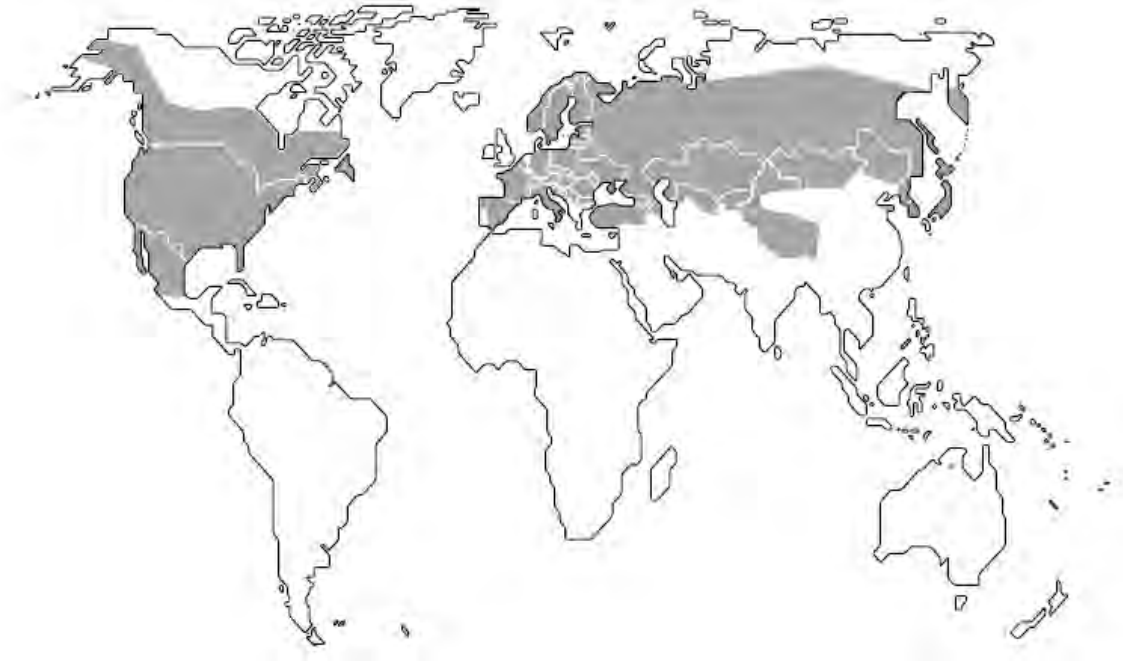


Рисунок 1.2. Мапа поширення туляремії в світі (сірим позначено зони, ендемічні з туляремії) [7]

Ендемічні вогнища тривалий час існували і продовжують існувати в Російській Федерації, Казахстані та Туркменістані [40], а також у Фінляндії та Швеції [5], [7]. На території колишнього Радянського Союзу з 1930 по 1970 р. реєстрували дуже багато спалахів туляремії. Масова вакцинація людей на територіях природних осередків захворювання вакциною Гайського від туляремії, розробленою в 1942 р., а також знищення водяних щурів та ондатр сприяли істотному зниженню кількості захворювання. Зараз, для території Російської Федерації типовою є реєстрація приблизно 50-150 випадків захворювань серед людей на рік [5], [40], [53]. Про щорічні випадки повідомляють в більшості країн Східної Європи, тоді як у країнах континентальної Західної Європи зареєстровано небагато випадків. Під час

спалаху в Іспанії у 1997-1998 роках захворіло 559 осіб. Більшість з них тим чи іншим чином мали контакт із зайцями: розтинали тушки чи готували сире м'ясо. Високий процент інфікування зайців туляремією пов'язують з щорічним імпортом зайців з ендемічних щодо туляремії регіонів для розвитку мисливства. Другий спалах на території Іспанії у 1998 році був пов'язаний з водним шляхом передачі туляремії. Захворіло 19 осіб, що контактували з річковими раками. Також, спалахи, що включають сотні випадків, реєстрували на території Португалії, Швеції та інших країн північної Європи [54].

Часто спалахи туляремії пов'язують з проведенням військових дій. Так, в провінції Косово (Сербія), що перебуває під адміністрацією ООН, у 1999-2000 р. стався спалах туляремії серед населення. Р. Рейнтес та співавтори пов'язують цей випадок з підвищенням чисельності гризунів, природно інфікованих збудником туляремії, на покинутих полях та у жилих домівках, а також із вживанням контамінованої сирої питної води [55].

Під час Другої світової війни на території колишнього Радянського Союзу відбулося масове збільшення популяцій польових і домашніх мишей через великі площі покинутих орних земель, що залишилися некультивованими. До початку війни *A. terrestris* був головним джерелом збудника туляремії в лісовому поясі від Волги до Кавказу і Польщі, але після початку бойових дій польові і домові миші стали відігравати важливішу роль у поширенні епізоотій. Таке швидке зростання популяцій гризунів згодом призвело до великих спалахів туляремії. У Росії взимку 1941–1942 рр. було зареєстровано 67 тис. випадків захворювань на туляремію. Випадки туляремії в Росії також були зафіксовані під час інших військових дій, наприклад, під час продовження війни між Фінляндією та Радянським Союзом у Карелії між 1941 і 1944 рр. Також, існує думка, що спалахи туляремії, у результаті яких було інфіковано десятки тисяч радянських і німецьких солдатів на

східноєвропейському фронті під час Другої світової війни, можливо, були результатом навмисного використання *F.tularensis* як агента біозброї. Однак, досі це не було достовірно доведено. Офіційна версія причини масового інфікування людей – масове розмноження гризунів-переносників туляремії внаслідок затримки збору врожаю злаків на територіях навколо Ростова-на-Дону і Сталінграда, де проводились інтенсивні бойові дії, та подальша контамінація бактеріями пилу та соломи. Масове розповсюдження *F. tularensis* під час Другої світової війни призвело до інфікування ектопаразитів гризунів, що призвело до збереження циркуляції бактерії навіть після нормалізації популяцій гризунів. У 1940-х роках у Радянському Союзі було близько 100000 щорічних випадків туляремії, що були пов'язані не тільки з інфікуванням через живих гризунів, а і з мертвими тваринами, їх екскрементами та забрудненими запасами зерна і води. Через військові дії, протитуляремійні, як і протичумні станції, були зруйновані, тому проведення запобіжних заходів було неможливим. Ситуація почала налагоджуватися тільки наприкінці 50х років завдяки проведенню запобіжних заходів та масовій вакцинації населення в природних осередках живою атенуйованою вакциною із *F.tularensis* subsp. *holarctica*, розробленою Гайським у 40х р. [1], [5], [8], [56].

Повідомляється також про випадки захворювання на туляремію в Японії та північно-західних і північно-східних районах Китаю. У західній півкулі випадки регулярно трапляються в США і Канаді. У США щорічно з 1990 по 2000 р. повідомлялося про 120 випадків. Більше 50% цих випадків відбулося в Арканзасі, Міссурі, Південній Дакоті і Оклахомі. Про малі спалахи неодноразово повідомляли з виноградника острова Марта в Массачусетсі. Одним із загальновідомих випадків розповсюдження туляремії в Америці став спалах серед лучних собачок, що були виловлені для комерційного розведення і утримувались у дуже тісних умовах [7], [54].

### **1.4.3. Ситуація щодо туляремії в Україні**

#### **1.4.3.1. Захворюваність серед людей**

Перші офіційні випадки туляремії в Україні було зареєстровано в 40х роках. Вони були пов'язані з професійним інфікуванням працівників хутряних та цукрових виробництв. У 1948-1949 р. смертельні випадки від туляремії були зареєстровані на території всіх областей країни. В 1960 р. захворюваність на туляремію різко знизилася в результаті виявлення природних осередків і проведення спеціальних заходів органів охорони здоров'я, а саме: вакцинації людей, що проживають у природних вогнищах, та зменшення популяцій щурів [14, 57]. Наприкінці 1980-х і 1990-х років в степових областях України - Одеській і Миколаївській - знову була зареєстрована епідемічна активність вогнищ туляремії з відносно масовим захворюванням людей, а також постійна активність зареєстрована на о.Бірючому [58].

За офіційними даними «Центру громадського здоров'я» МОЗ України та Обласних лабораторних центрів МОЗ України, на даний момент, спалахи туляремії серед людей зазвичай трапляються у вигляді кількох поодиноких випадків на рік, з перетіканням хвороби у легкій та середній формах, часто з формуванням бубонів. Останній випадок інфікування людини туляремією в Україні зареєстровано в серпні 2020 року в Херсонській області. Був інфікований єгерь та його дружина, що контактували із тушкою дикого зайця, знайденого у лісі. Щеплення проти туляремії наразі в Україні не проводиться.

#### **1.4.3.2. Епізоотичний стан**

Незважаючи на рідкісне виявлення туляремії в Україні серед людей, епізоотична ситуація залишається неблагополучною. Збудник туляремії циркулює на території України в популяціях дрібних ссавців, зокрема зайців (*Lepus europaeus*), домових, лісових, польових та інших мишей (переважно,

види *Mus musculus*, *Sylvaemus uralensis*, *S. sylvaticus*, *S. tauricus*, *Apodemus agrarius*, *Micromys minutus*, *M. oeconomus*, *Terricola subterraneus*), полівки (*Myodes glareolus*, *Microtus levis*), водяних щурів (*Arvicola amphibius*), землерийок (*Sorex araneus*, *S. minutus*, *Neomys fodiens*, *Crocidura suaevolens*), хом'ячків сірих (*Cricetulus migratorius*), сонь лісових (*Dryomys nitedula*) та інших гризунів [13], [15].

Гризунів та зайцеподібних на території України завжди вважали основними носіями інфекції в природних осередках. Перші спалахи серед людей були пов'язані з розтином тушок зайцеподібних, з підвищенням кількості гризунів біля цукрових заводів та в скирдах [14], [15], [57]. Заєць-русак (*Lepus europaeus*) – дуже чутливий до інфікування збудником туляремії вид, що може пересуватись на далекі відстані, має довгу тривалість життя, і на ньому живляться всі три стадії розвитку кліщів *Dermacentor reticulatus* і *Ixodes ricinus*. Наразі, роль зайця-русака у підтриманні циркуляції *F.tularensis* відходить на другий план, особливо в умовах перебудови степових ландшафтів і знищення місць проживання зайців [58]. Звичайна полівка *M. arvalis*, руда полівка *M. glareolus* та миша хатня *M. musculus* відносяться до першої групи чутливості щодо збудника туляремії, що визначається високою кількістю бактерій у крові та внутрішніх органах, а також швидким перебігом інфекції. У роки масових розмножень і епізоотій звичайна полівка та миша хатня служать основним джерелом інфекції туляремії для людини, так як чисельно переважають над іншими видами в населених пунктах і скирдах. Але в останні роки, у зв'язку зі скороченням поголів'я худоби, в багатьох областях України, особливо в степових та лісостепових зонах, стало менше скирд, що знизило їх значення як стації переживання гризунів в зимовий період і скоротило можливості розвитку скирдових епізоотій. У листяних лісах велику

роль у епізоотіях відіграє руда полівка, що є масовим за чисельністю видом у цьому біотопі [15], [58].

Векторна передача збудника туляремії членистоногими також є важливим фактором трансмісії туляремії. З самого початку реєстрації хвороби у 40х роках і дотепер найбільшу роль у епізоотіях надають кліщам видів *Dermacentor reticulatus* (= *D. pictus*) і *Ixodes ricinus*. Ці види є дуже поширеними на території України, а також вони є носіями туляремійної інфекції частіше за інші види. Крім них, туляремію можуть переносити інші кліщі сімейства *Ixodidae*, частіше це кліщі родів *Hyaloma sp.*, *Haemaphysallis sp.*, *Rhipicephalus sp.*, та інші види родів *Ixodes sp.*, *Dermacentor sp.*, наприклад, *Dermacentor marginatus*. [14], [57], [58].

Також, хворобу поширюють гедзі, комарі родів *Culex*, *Aedes* та інші комахи, але досліджень з цього приводу майже не проводиться [57].

Дику та синантропну фауни України населяє велика кількість ссавців, що можуть бути потенційно інфіковані туляремією та відігравати велику роль у циркуляції та підтриманні життєдіяльності захворювання: дикий кабан, сарна європейська, коти, собаки та інші тварини. Одомашнені тварини, такі як рогата худоба і свині, також можуть нести в собі небезпеку для громадського здоров'я. Однак, дані з приводу досліджень цих тварин на території України відсутні [2], [4], [14].

### **1.5. Методи лабораторної діагностики туляремії**

Діагноз на туляремію встановлюється комплексно, з урахуванням клінічних спостережень та результатів лабораторної діагностики. Існує широке коло діагностичних методів для *F.tularensis*, які можна поділити на 3 основні групи: бактеріологічні, серологічні, молекулярно-генетичні, та

методи, що з ними пов'язані: флуоресцентна *in situ* гібридизація, імуногістохімія та інші [3], [7].

### 1.5.1. Культивування збудника туляремії

Збудник туляремії - *F. tularensis* – грам-негативна коккоїдна бактерія, розміром від 0,2 до 0,5 мкм на (0,7-1,0) мкм. Бактерії поодинокі, не формують ланцюжків чи інших структур [59]. Згідно з рекомендаціями CDC щодо туляремії, для референс-лабораторій, що підтверджують туляремійну інфекцію, культивування *F.tularensis* та визначення властивостей культури залишається «золотим стандартом». Однак, культивування збудника туляремії – досить складна задача [54].

Збудник туляремії при культивуванні є дуже вибагливим: він вимагає збагачених поживних середовищ з обов'язковим вмістом цистеїну. Традиційно, для культивування використовують цистеїново-глюкозний кров'яний агар (середовище Френсиса чи модифікації), цистеїновий кров'яний агар з серцевим та мозковим екстрактами та шоколадний агар. Згідно з рекомендаціями МЕБ, стандартними середовищами для культивування є також середовище Мак-Коя і Чепіна з використанням коагулованих яєчних жовтків, а також середовище Тайєр-Мартіна [3], [59], [60].

*F. tularensis* зростає на твердих середовищах повільно, для отримання окремих колоній необхідно 2 - 4 дні інкубації за температури 37 ° С. На кров'яному агарі може розвиватись невелика зона альфа-гемолізу. На рідких середовищах *F. tularensis* росте погано і потребує багато інокуляту. Зростання в аеробному збагаченому середовищі може продовжуватись не менше тижня. Виявлення *F. tularensis* і диференціацію на підтипи проводить шляхом спостереження за культуральними та біохімічними характеристиками: *F. tularensis* не росте на звичайних середовищах (хоча деякі дослідження,



спростовують цю тезу [61]), бактерії не формують спор, є нерухомими, біполярними і однорідними в свіжих культурах. Вони формують мукоїдний тип колоній, зазвичай молочного кольору. *F. tularensis* типу А ферментує гліцерол, завдяки чому її можна відрізнити від *F. tularensis* типу В [3, 54, 59, 62]. У дослідженнях М. Пейне та Р. Мортонна було показано, що *F. tularensis* типу В більш толерантна до високих температур (42°C) ніж *F. tularensis* типу А [61].

Виділення чистої культури збудника туляремії із клінічних зразків та зразків середовища дуже ускладнюється внаслідок сильної контамінації іншими бактеріями, що швидше ростуть та менш вибагливі до умов культивування, що призводить до пригнічення росту *F. tularensis*. Загальний відсоток вдалої ізоляції чистих культур з трупів тварин часто сягає не більше 30%. Висока чутливість *F. tularensis* до антибіотиків ускладнює їх використання при виділенні чистих культур. Однак, Дж. Петерсен та співавтори продемонстрували, що транспортування зразків за низьких температур та використання шоколадного агару з додаванням суміші антибіотиків (СНАВ-А) – 7,5 мг колістину, 2,5 мг амфотеріцину, 0,5 мг лінкоміцину, 4 мг тріметоприму, 10 мг ампіциліну на 1 літр середовища - підвищує ефективність ізолювання чистої культури збудника з трупів інфікованих тварин до 84, 8% [3], [16].

З метою подолання складнощів з виділенням чистої культури *F. tularensis*, у якості проміжного методу можна використовувати біопробу на лабораторних мишах. При цьому, шматок ураженого органу вагою до 1 г ресуспендують у 1 мл фізіологічного розчину і вводять підшкірно лабораторній тварині. При розвитку туляремії тварини помирають через 2-10 днів після ін'єкції. В день смерті лабораторної тварини кров з серця або підготовлену суспензію уражених органів засівають на поживні середовища

для ізолювання збудника туляремії. Але метод інокуляції тварин рекомендується використовувати у разі неможливості виділити *F. tularensis* іншими способами, при дотриманні всіх необхідних правил біобезпеки [3].

Загалом, дослідження, що передбачають культивування *F. tularensis*, несуть у собі високий ризик інфікування лабораторного персоналу. Але, незважаючи на все вищесказане, тільки виділення збудника у чисту культуру забезпечує остаточне підтвердження діагнозу, а також є безцінним ресурсом для проведення подальшого більш глибокого вивчення *F. tularensis* у розрізі молекулярної епідеміології, дослідження підтипів, підвидів і видів, а також всіх інших характеристик бактерії [54].

### **1.5.2. Серологічні методи дослідження збудника туляремії**

Серологічні методи використовують в лабораторній діагностиці дуже часто через швидкість їх виконання та більшу безпечність для лабораторного персоналу, у порівнянні з мікробіологічними дослідженнями. Однак, специфічні до збудника туляремії антитіла з'являються в зараженому організмі не раніше ніж за два тижні після інфікування. Тому, частіше за все, серологічними методами досліджують зразки від людей, у той час як більшість тварин гине від туляремії ще до напрацювання специфічних антитіл. Також, можна проводити серологічні дослідження сироваток крові тих тварин, які хворіють на туляремію безсимптомно або відносно стійкі до неї, а саме: велика рогата худоба, дрібна рогата худоба, свині, лосі, собаки, коти, лисиці, дикі кнурі, птахи, сарна та європейський коричневий заєць. IgM, IgA і IgG антитіла з'являються одночасно після початкового інфікування, IgM та IgG антитіла можуть циркулювати в організмі після інфікування протягом багатьох років [3, 54].

За рекомендаціями МЕБ, у якості антигенів до імуноглобулінів IgA, IgM і IgG можуть використовуватися цільноклітинні препарати (виготовлені з бактерій, що піддавались нагріванню за температури 65°C протягом 30 хвилин), різні протеїни, а також субклітинні компоненти (наприклад, очищені ліпополісахариди) [3]. Зазвичай, у якості антигену для серологічних тестів щодо *F. tularensis* використовують ліпополісахариди. Також, у якості антигенів, використовують протеїни ForA, карбогідратно-протеїнові фракції зовнішньої мембрани (OMP) та вбиті клітини *F. tularensis* цілком [7, 9].

Між підвидами збудника туляремії типу А і типу В немає різниці в антигенному складі, тому, в цілях безпеки, у серологічних тестах зазвичай використовують антигени менш вірулентного підвиду *F. tularensis* sbsp. *holarctica* та його атенуйований живий вакцинний штам LVS [9].

Одним з найпростіших серологічних тестів щодо виявлення антитіл проти *F. tularensis* є реакція аглютинації (РА). Наразі, існує багато різновидів цієї реакції, а саме: реакція мікроаглютинації, реакція аглютинації в пробірці, реакція аглютинації на предметному склі. Даний аналіз легко проводити навіть в умовах польових досліджень, його можна використовувати для дослідження зразків від людей, а також від тварин різних видів, але для його проведення не підходить гемолізована сироватка, а також він має низьку чутливість і специфічність [63, 64].

Імуноферментний аналіз (ІФА), англійська назва enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), є більш чутливим та специфічним методом в порівнянні з РА. Є багато різновидів ІФА: прямий, непрямий, сендвіч та конкурентний, а також різноманітні їх поєднання та вдосконалення [64, 65].

Прямий ІФА: в основі методу покладений безпосередній контакт антитіла з антигеном. Антитіло чи антиген помічають ферментом, що дає змогу проводити вимірювання кількості зв'язаних пар антиген-антитіло. Під

час аналізу проводять серії відмивок для видалення незв'язаних помічених антитіл чи антигенів з реакції. Для фотометричної оцінки результатів до реакції додають субстрат та вимірюють оптичну густина зразків. Чим вище оптична густина зразка, тим вище в ньому титр антитіл [65].

Непрямий ІФА: відрізняється від прямого ІФА тим, що досліджують тільки сироватки з первинними антитілами, що додаються до плашок з антигеном для утворення комплексу антиген-антитіло. Після чого, до реакції додаються мічені вторинні антитіла, що розпізнають первинні антитіла. Всі незв'язані антитіла видаляють при проведенні декількох серій відмивок. Цей метод є більш специфічним і дає нижчі фонові значення, ніж прямий ІФА, але для дослідження сироваток від кожного окремого виду тварин необхідні окремі специфічні до первинних антитіл вторинні антитіла. Так само, як і для прямого ІФА, чим вище оптична густина зразка, тим вище в ньому титр антитіл [65].

«Сендвіч»-ІФА: реакція заснована на розпізнаванні різних епітопів досліджуваних антитіл. Під час цієї методики, плашку покривають іммобілізованими антитілами та блокують, після чого до лунок додається зразок сироватки, що досліджується. Після проведення контакту, відмивають незв'язані антитіла і додають мічені антитіла, специфічні до антигену. Для того щоб виявити активність ферментів, як і в попередніх методиках, до реакції додають ферментний субстрат. Чим менша ступінь флуоресценції, тим більше було специфічних антитіл в сироватці. Цей тип ІФА вважають в 2-5 разів специфічнішим за інші типи [65, 66].

Конкурентний ІФА: цим методом досліджують як антигени, так і антитіла. Принцип методу полягає в конкуренції первинних антитіл із сироватки і вторинних мічених антитіл за розташований на плашці антиген. При дослідженні антигенів, антигени із зразка та вторинні мічені антитіла

конкурують за зв'язування із розташованими на плашці антитілами. Під час проведення цього аналізу, до плашки з антигеном чи антитілами спочатку додають досліджений зразок, після чого вимивають його і додають помічені ферментами антитіла, що також специфічні до реагентів на плашці. Чим більше формується зв'язків антиген-антитіло між реагентом на плашці і зразком, тим менше зв'язків формується між реагентом на плашці і конкурентними антитілами. Тому, при слабкому сигналі реакції ферменту з субстратом (тобто, за низької оптичної щільності зразків) зразок вважають позитивним (зворотня пропорція). Цей метод зазвичай демонструє нижчий фоновий сигнал та меншу кількість хибно-позитивних результатів, ніж прямий та непрямий методи ІФА, та дозволяє досліджувати широкий видовий спектр матеріалу від тварин, не змінюючи реагенти під конкретні види [65].

Обидва методи серологічної детекції антигенів чи антитіл збудника (РА та ІФА) можуть давати хибно-позитивні результати, в залежності від того, що використовується у якості антигену. Для реакцій, заснованих на ліпополісахаридних антигенах збудника туляремії, характерні перехресні реакції з антитілами інших бактеріальних патогенів: *Brucella sp.*, *Yersinia enterocolitica* серотип О:9, *E. coli* серотипи О:116 та О:157, деякі серотипи *Salmonella sp.* та *Stenotrophomonas maltophilia*, оскільки ці бактерії мають подібні структури О-антигенів [67, 68]. Згідно з рекомендаціями ВООЗ, РА та ІФА необхідно поєднувати з методикою Вестерн-Блотингу (імуноблотингу), для підтвердження позитивних результатів щодо туляремії [7].

Принцип методу імуноблотингу полягає в отриманні унікального ліпополісахаридного паттерну збудника туляремії. Для цього спочатку проводять вертикальний гель-електрофорез ліпополісахаридів збудника туляремії з подальшим їх перенесенням на нітроцелюлозну мембрану, до якої додають досліджувану сироватку і мічені вторинні антитіла. У результаті

утворення комплексу антиген-антитіло-мічене вторинне антитіло та кольорової реакції зв'язаних мічених вторинних антитіл з субстратом на мембрані з'являється специфічний паттерн ліпополісахаридів *F.tularensis*. Поєднання РА чи ІФА з імуноблотингом забезпечує майже 100% специфічність, хоча в такому разі дослідження потребує значно більше часу і матеріальних витрат [7, 9, 69, 70].

### **1.5.3. Дослідження збудника туляремії методом полімеразної ланцюгової реакції**

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) відноситься до молекулярно-генетичних методів досліджень. Суть методики полягає в визначенні та напрацюванні специфічних ділянок геному досліджуваного організму. Комплементарні до таргетних ділянок олігонуклеотидні праймери зв'язуються з денатурованою ДНК досліджуваного організму (відпал), після чого запускається саме полімеразна реакція (елонгація), під час якої відбувається напрацювання необхідної ділянки гену. Денатурацію, відпал та елонгацію проводять циклічно, повторюючи 30-50 разів, в результаті чого таргетна ділянка гену копіюється у геометричній прогресії з кожним циклом. Множинні повторювання циклів реакції необхідні для отримання великої кількості таргетних послідовностей (ампліконів), після чого їх детектування стає можливим. При проведенні класичної ПЛР детекція ампліконів проводиться методом їх електрофортичного розгону в агарозному гелі. Для проведення ПЛР у реальному часі, до суміші компонентів реакції додають третій специфічний олігонуклеотидний праймер, мічений флуоресцентною міткою (зонд), що випромінює сигнал при проведенні кожного циклу реакції [71, 72, 73, 74].

ПЛР є більш специфічним і чутливим методом, в порівнянні з мікробіологічними та серологічними методами дослідженнями збудника туляремії. Він є також швидким, безпечним та дає можливість досліджувати як клінічні зразки (кров, гомогенати органів, зразки виразок при виразково-залозистому перебігу хвороби, пунктати бубонів), так і зразки середовища (вода, ґрунт, сіно, пелетки хижих птахів), а також інший біологічний матеріал, ймовірно контамінований *F. tularensis*: кліщі, москїти, гедзі і т.д. При дослідженні клінічного матеріалу щодо *F. tularensis* бувають випадки, коли збудник не вдається висіяти в чисту культуру. В такому разі ПЛР є надійною перевіркою методикою. Можливість детектувати генетичний матеріал збудника одразу після інфікування без необхідності очікувати декілька тижнів для постановки діагнозу, як, наприклад, у разі використання серологічних методик, також є однією із переваг ПЛР у клінічній діагностиці та при проведенні запобіжних заходів при епізоотіях [71-75].

За рекомендаціями МЕБ та ВООЗ, для детекції збудника туляремії найчастіше обирають ділянки генів, що кодуєть зовнішньомембранні протеїни: *tul4*, *fopA*, але використання інших специфічних ділянок генів, наприклад 16S, також можливе. За допомогою ПЛР легко диференціюють підтипи *F. tularensis*, визначаючи наявність чи відсутність делецій або інсерцій в геномі. Наприклад, тип А збудника туляремії можливо відокремити від типу В за наявністю гену *pdpD*, а *F. tularensis* subsp. *novicida* містить у вищезазначеному гені інсерцію розміром 144 п.н. [3, 7, 74, 76, 77].

Для проведення ПЛР у якості матриці використовують нуклеїнові кислоти, виділені з досліджуваного матеріалу. Методи виділення ДНК збудника туляремії різняться, і найпоширеніші з них – кип'ятіння, виділення фенол-хлороформним методом та виділення НК за допомогою сорбенту.

Також, на ринку існують у наявності різноманітні комерційні набори, що базуються на перелічених методах чи їх вдосконалених варіантах [78-81].

#### 1.5.4. Генотипування збудника туляремії

Історично підтипи *F.tularensis* диференційували за біохімічними характеристиками, а підтипи А і В також були диференційовані за допомогою 16S рРНК гібридизації. Зважаючи на те, що збудник туляремії загалом є досить інертним у біохімічному плані, більш глибока його диференціація таким шляхом неможлива. Серологічні типування також не дають очікуваних результатів через те, що штами *Francisella* мають подібну антигенну структуру [62, 82].

Генетичні дослідження збудників різноманітних інфекцій дозволяють отримати більш детальну інформацію щодо досліджуваних ізолятів: виокремлення їх підтипів, дослідження філогеографії, еволюції, клінічних особливостей збудників та інших характеристик, що необхідні для глибокого розуміння їх циркуляції, екології та епідеміології. Звичайно, повногеномне секвенування є найкращим варіантом для дослідження генетичних особливостей інфекційних збудників, але наразі воно є значно дорожчим, ніж будь-яке генотипування. Тому, генотипування досі залишається прийнятним і ефективним методом для вирішення всіх вищезазначених питань.

Незважаючи на відмінності у вірулентності та географічному походженні різних ізолятів, *F. tularensis* була описана як генетично однорідний вид з обмеженою різноманітністю. У цьому відношенні деякі молекулярні методики здатні розрізнати тільки види чи основні підтипи в межах роду [76, 83]; однак, інші методи, засновані на визначенні послідовностей повторюваних елементів (rep-PCR), аналізі випадкових ампліфікованих поліморфних ДНК (RAPD), канонічному аналізі



поліморфізму одиночних нуклеотидів (canSNP), визначенні розміру алелів (VNTR, MLVA), успішно продемонстрували мінливість серед підвидів і окремих штамів *F. tularensis*. [10-12, 71, 84, 85].

Одним із найпоширеніших методів генотипування *F. tularensis*, рекомендованим ВООЗ, є мультилокусний аналіз тандемних варіабельних повторів (MLVA). Зазвичай, принцип даного методу заснований на детекції 25 локусів та кількості їх тандемних повторів у геномі збудника туляремії, що разом складають унікальний паттерн для кожного штаму. Він показує відмінну дискримінацію окремих ізолятів і надає інформацію про структури популяцій і філогенетичні відносини в межах виду *F. tularensis* (табл. 1.1) [11].

Таблиця 1.1. Перелік локусів, що мають тандемні повтори у *F. tularensis*, та їх місцезнаходження для штаму SCHU4 [11]

Маркер	Локація в геномі
Ft-M1	277650–959
Ft-M2	1886647–7109
Ft-M3	308585–9016
Ft-M4	316972–7405
Ft-M5	1649600–807
Ft-M6	1442674–984
Ft-M7	1868734–940
Ft-M8	8155–440
Ft-M9	3930–4177
Ft-M10	1283441–4086
Ft-M11	1628132–523
Ft-M12	801242–586
Ft-M13	1169264–588
Ft-M14	1390169–610, 1783513–954
Ft-M15	1473082–303
Ft-M16	176810–7030
Ft-M17	1010288–638
Ft-M18	1483015–386
Ft-M19	1524117–432
Ft-M20	736003–257
Ft-M21	1572002–404
Ft-M22	603279–519
Ft-M23	620493–927
Ft-M24	685645–6103
Ft-M25	864491–641

Зараз ця методика має назву «фінгерпринтингу» (від англійської *finger print* – відбиток пальців), так як вона дозволяє отримувати не тільки

інформацію щодо вірулентності ізолятів та їх приналежності до різних видів та підтипів, а також і їх походження, спорідненість між собою, імовірні джерела спалахів інфекцій і їх поширення [11, 12, 85].

Інформація, отримана при генотипуванні, може бути перетворена та згрупована у кластери за допомогою переліку статистичних методик: невваженого попарного групування з середнім арифметичним (UPGMA), приєднання сусідів (NJ), методу Варда, бутстреп – аналізу, методів побудови супер дерев та інших. Ці методи дозволяють оцінити ступінь спорідненості ізолятів чи штамів між собою та візуалізувати результати шляхом побудови філогенетичних дерев. Кожен метод має свої переваги і недоліки, та обирається залежно від методу генотипування та характеристик досліджуваної вибірки [86].

### **1.6. Висновок з огляду літератури**

Туляремія - це захворювання, що викликається грам-негативною, неспоровою, факультативно-внутрішньоклітинною бактерією *Francisella tularensis*. Це антропозоозна, природно-опосередкована інфекція, розповсюджена на території північної гемісфери, куди також входить і Україна. Починаючи з 1940-х років, на території України було зафіксовано спалахи туляремії з численним захворюванням людей майже у всіх областях країни. З 1960-х років кількість спалахів туляремії пішла на спад завдяки масовій вакцинації людей у природних осередках вакциною Гайського, а також діяльності протитуляремійних служб, що проводили дослідження природних осередків та дератизаційні заходи. Наразі, 23 області країни епізоотологічно неблагополучні з туляремії. Поодинокі випадки захворювання серед людей в Україні реєструють кожен рік.

Природні резервуари інфекції - зайцеподібні (зайці та кролі) та гризуни,

крім цього також можлива векторна передача інфекції за допомогою кровосисних комах і кліщів. Незважаючи на великий обсяг знань щодо методів передачі, носіїв та векторів туляремії, фактори, що призводять до розповсюдження і спалахів туляремії серед людей, і досі точно не визначені. Вважають, що захворювання серед людей пов'язане зі зниженням санітарних норм у місцях проживання, військовими діями та зростанням популяцій гризунів, але спалахи відбуваються і за інших, і досі не повна зрозумілих причин.

Існує перелік методів, за допомогою яких діагностують туляремію: виділення збудника в чисту культуру, серологічні методи з виявленням антитіл до збудника чи його антигенів, молекулярно-генетичні методи з виявленням геному *F.tularensis*, імуногістохімічні методи та інші.

Для культивування *F.tularensis* необхідно використовувати спеціальні поживні середовища, такі як середовище FT, середовища Чепіна та Мак-Коя, що збагачені цистеїном. Туляремія відноситься до бактерій, що повільно ростуть в культурі та надзвичайно складно виділяються з польових зразків. Зважаючи на те, що туляремія відноситься до категорії особливо небезпечних хвороб, мікробіологічні дослідження повинні проводитись за належних умов при дотриманні вимог біобезпеки.

Для діагностики туляремії використовують також серологічні методи. Зазвичай, це реакція аглютинації, імуноферментний аналіз та Вестерн-блотинг. Серологічні методи швидкі, прості та безпечні у виконанні, але вони менш чутливі та можуть давати крос-позитивні реакції з іншими бактеріями, що мають схожий склад зовнішньомембранних протеїнів, наприклад, з *Brucella spp.*, *Yersinia spp.* та іншими. Поєднання РА та ІФА з Вестерн-блотингом значно підвищує специфічність діагностики, але потребує більше часу на проведення досліджень.

Полімеразна ланцюгова реакція є способом діагностики генетичного матеріалу збудника туляремії. Крім швидкості проведення, специфічності та чутливості, цей метод також безпечний для лабораторного персоналу. Генотипування та секвенування дозволяють визначати генетичні характеристики штамів, завдяки чому можна отримувати дані про еволюцію, походження та розповсюдження *F.tularensis*, а також прогнозувати нові спалахи. Найпоширенішим методом типування *F.tularensis* наразі є MLVA.

Зважаючи на те, що туляремія є ендемічним захворюванням на території України, а також на проведення військових дій на сході, епізоотологічні дослідження *F. tularensis* в Україні є дуже актуальними. Через недостачу вітчизняних засобів для детекції *F. tularensis* як при проведенні епізоотологічного нагляду, так і серед людей, існує потреба розробки та впровадження засобів ідентифікації збудника туляремії. Саме через це, мета наших досліджень полягала у розробці і вдосконаленні полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу для діагностики туляремії. Також, був проведений молекулярно-генетичний скринінг та серомоніторинг щодо поширення туляремії на території України.

## **РОЗДІЛ 2**

### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Дослідження, результати яких викладені у дисертаційній роботі, виконані в період з 2015 по 2020 рр. у відділі молекулярної епізоотології та діагностики Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Частину експериментальних даних було отримано на базі Інституту мікробіології Бундесверу (Мюнхен, Німеччина) та за сприянням GIZ GmbH у рамках проекту «Україно-німецька ініціатива «Біологічна безпека для управління ризиками зоонозів на територіях, які розташовані біля зовнішніх кордонів країн-членів Європейського союзу».

#### **2.1. Матеріали для проведення досліджень**

##### **2.1.1. Вакцинний штам**

При проведенні досліджень у якості позитивного контролю та матриці для отримання рекомбінантного позитивного контролю, а також для отримання ЛПС для серологічних досліджень використовували вакцинний штам 15 Гайського, люб'язно наданий ДУ «Український науково-дослідний протичумний інститут імені І.І.Мечнікова МОЗ України».

##### **2.1.2. Матеріали для культивування вакцинного штаму**

Для культивування вакцинного штаму були використані мізково-глюкозо-сердечний бульйон («Carl Roth», США) та цистеїново-серцевий агар («Becton Dickinson», США) з додаванням 10% жовточної емульсії («Merck», США). Культивування проводили у термошейкері MaxQ4000 («Thermo Fisher Scientific», США) (для бульйонних культур) та термостаті IFC-240-8 Isotherm («ESCO», Сінгапур) (для культур на твердому агарі). Кріоконсервацію

вакцинної культури проводили за використанням мікробанків («Pro-Lab» Diagnostics, Канада). Роботи з культурою проводили у шафі біологічної безпеки 2 типу MSC Advantage («Thermo Fisher Scientific», США).

### 2.1.3. Зразки ДНК-лізатів

При проведенні MLVA-генотипування були використані 20 ДНК-лізатів культур *F.tularensis*, люб'язно наданих Н.Б.Видайко (завідуюча лабораторією особливо небезпечних інфекцій Центру громадського здоров'я МОЗ України).

### 2.1.4. Матеріали для проведення MLVA-генотипування

MLVA-генотипування проводили з використанням 13 VNTR-локусів *F.tularensis* [11, 85]. Для проведення дослідження використовували Multiplex PCR kit (Quiagen, США), деіонізовану воду та праймерні системи (TIB MOLBIOL, Німеччина), наведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

#### Праймерні системи, використані для проведення MLVA-генотипування ізолятів *F.tularensis* [85]

Локус	Праймер F, 5'→3'	Праймер R, 5'→3'
Ft-M22	GTCAAAATCTCAAGATGAGCA AATATTTGAATGGT	GGAGTTTTTTCTCGTCCGCTGTTAG TGATTT
Ft-M03	GTTTTACGCTTGTCTCSTATC A	CAAAAGCAACAGCAAAATTCACAA A
Ft-M23	TGAGATGTGGAACSTTTATAGG TTCAA	TGTAACSTAAAAGATAACTAATGG CAATTT
Ft-M24	ATACGGTCСТААТААТАТТССТ GTCA	ATTCATTTATAGATGCSTTTGTTAC C

Продовження таблиці 2.1.

Локус	Праймер F, 5'→3'	Праймер R, 5'→3'
Ft-M20A	GTATATCTTGGAATAAGCCG GAGTTAGATGGTTCT	GCAATAACTTTATCACCCCTTATTGTA GACTGCTTCTGC
Ft-M10	GTTGGCGAACСТААААТААТ AGC	CAGCTCGAACTCCGTCАТАС
Ft-M05	TAGGCATGACAAACCCTGCT AT	CAGCTCGAACTCCGTCАТАС
Ft-M26	AATACTCGCTTCTATCTTTCT GGT	AATCTTTTGGAGAGGTTTТATТСА
Ft-M04	AAAAGGGCGGGTТАCTGAGG	GTATCAAATAGCGCAAAAATAACTG C
Ft-M20B	GGGTGATAAAGTTATTGTТА ATGGTGTGACTTATGAA	GТАACTACTTGACCGCCAGTATATGC TTGACCT
Ft-M06	TTTTGGGTTTTCTCTAAACAT TTCTA	CAATTCAGCGAAACCCTATCTТА
Ft-M02	TTTATGATAAGGATGATTTA AAACAAAATA	GCTTAAATCTCGCAATACCATGTAAT

Реакцію проводили з використанням приладу Genescan 1200 LIZ POP 7.

Аналіз результатів і побудову філогенетичних дерев проводили методом невваженого попарного середнього (англ. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)).

### **2.1.5. Зразки для дослідження серологічними та молекулярно-генетичними методами**

З метою аналізу щодо поширення туляремії на території України дослідили 701 зразок сироваток крові від диких кабанів із 18 областей України (Вінницька, Донецька, Житомирська, Запорізька, Івано-Франківська, Кіровоградська, Київська, Луганська, Одеська, Полтавська, Рівненська,

Сумська, Тернопільська, Харківська, Херсонська, Хмельницька, Чернівецька, Чернігівська), люб'язно наданих д.вет.наук. Ситюком М.П., заступником директора ІВМ НААН України.

Крім цього, з метою вивчення епізоотичної ситуації щодо туляремії у природних осередках проводили дослідження хвостів гризунів, кліщів, пелет, зразків води та сіна на території Харківської (n=380), Дніпропетровської (n=105) та Миколаївської (n=501) областей. Зразки на території Харківської області були відібрані дисертантом власноруч, у складі зоологічної групи ДУ «Харківський ОЛЦ МОЗ України», а саме за участю головного ентомолога Харківської області Ткача Г.Є.; зразки для дослідження із Дніпропетровської області були люб'язно надані завідувачкою відділенням особливо небезпечних інфекцій Шамичковою Г.Р. (ДУ «Миколаївський ОЛЦ МОЗ України»); зразки із Миколаївської області були люб'язно надані завідувачкою відділенням особливо небезпечних інфекцій Винокуровою К.В. (ДУ «Миколаївський ОЛЦ МОЗ України»).

#### **2.1.6. Позитивні та негативні сироватки, використані для проведення серологічних досліджень**

При проведенні конкурентного ІФА (кІФА) та Вестерн-блотингу у якості позитивного і негативного контролів були використані позитивні і негативні сироватки, люб'язно надані Інститутом мікробіології Бундесверу.

#### **2.1.7. Матеріали для проведення кІФА та непрямого ІФА**

У якості антигену при проведенні *in house* кІФА були використані як комерційні ліпополісахариди *F.tularensis* («Micromun», Німеччина), так і ліпополісахариди, отримані із вакцинного штаму *F.tularensis* 15Г за допомогою комерційного набору LPS extraction kit («Intron», Південна Корея).



Рекомбінантні протеїни використовували у якості антигену при їх випробуванні. Імобілізація антигену була здійснена на твердій фазі полістирольних 96-лункових планшетів «PolySorb», протеїни – на планшетах «MaxiSorb» («Nunc», Данія). Карбонатний буфер для розведення ЛПС готували за наступними пропорціями (розрахунок на 1 л): 5,84 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  («Sigma-Aldrich», США) та 3,2 г  $\text{NaHCO}_3$  («Sigma-Aldrich», США) із доведенням рН до 9 (для ліпополісахаридів) і 9,5 (для рекомбінантних протеїнів) за допомогою концентрованих розчинів  $\text{NaOH}$  («Завод хімічних реактивів, Україна) та лимонної кислоти («Завод хімічних реактивів», Україна). Значення вимірювали рН-метром «Sartorius» PB-11, Німеччина. Фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) готували за наступним прописом (із розрахунку на 5 л): 2,15 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  («Sigma-Aldrich», США), 5,96 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  («Sigma-Aldrich», США) та 33,95 г  $\text{NaCl}$  («Sigma-Aldrich», США) із доведенням рН до 7,2. Буфер для відмивки плашки готували із ФСБ та 0,05% TWEEN-20 («AppliChem», Германія). Буфер для блокування плашки готували із ФСБ та 10% молочного порошку («Merck Millipore», США). Буфер для розведення сироваток та кон'югату готували із використанням ФСБ, 0,05% TWEEN-20 та 10% молочного порошку. У якості стоп-розчину використовували 0,25 М розчин  $\text{H}_2\text{SO}_4$  («Завод хімічних реактивів», Україна). У ході виконання методики був використаний кон'югат із гібридомних антитіл FF27/1/7/POD, отриманих в Інституті мікробіології Бундесверу і адаптованих у ННЦ «ІЕКВМ», та субстрат пероксидази хрину ТМВ/slow виробництва «Seramun» (Німеччина). Для термостатування плашок використовували інкубатор IFA-54-8 Isotherm («ESCO», Сінгапур). Результати оптичної щільності зразків визначали за допомогою ІФА-рідера Multiscan FC виробництва «Thermo Fisher Scientific», США.

### 2.1.8. Матеріали для проведення вертикального електрофорезу

Для проведення вертикального електрофорезу власноруч готували гель, що складався із 4% концентруючого гелю та 8% гелю для розгонки, до складу яких входили 30%-суміш акріламідів та бісакріламідів («Helicon», Російська Федерація), 1,5 М Tris-HCL з рН 8,8 («Serva», Німеччина), 1 М Tris-HCL з рН 6,8, 10% СДС («Carl Roth», США), TEMED («Helicon», Російська Федерація) та 10% АПС («Carl Roth», США). Заливку гелів та проведення вертикального електрофорезу проводили за використанням системи Mini-protean Tetra Handcast Systems фірми «Bio-Rad», виробництва США. Вертикальний електрофорез проводили у буфері для електрофорезу, що готували за наступним протоколом (на 1 л): 14,4 г гліцину («Carl Roth», США), 3г Tris («Acros Organics», Китай) та 1 г СДС. Для визначення молекулярної ваги використовували маркер SeeBlue Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen, США). Для завантаження зразків у гель готували 4x Laemmli-буфер, що складався з 1,6 мл 1М Tris-HCL з рН 6,8; 10% СДС; 2 мл гліцеролу («Sigma-Aldrich», США) та 8 мг бромфенолового синього («Helicon», Російська Федерація). Загальний об'єм доводили дистильованою водою до 10 мл. Перед завантаженням зразків у лунки, окрім Laemmli-буферу, до зразків додавали 35% 1М ДТТ (дитіотреїтол) («AppliChem», Німеччина) та прогрівали їх за температури 95°C протягом 5 хв на твердотільному термостаті ТТ-48 («Неоген», Україна).

### 2.1.9. Матеріали для проведення вестерн-блотингу

У якості антигену, як і при проведенні кІФА, були використані як комерційні ліпополісахариди *F.tularensis* («Micromun», Німеччина), так і ліпополісахариди, отримані із вакцинного штаму *F.tularensis* 15Г. Для проведення вестерн-блотингу використовували камеру, джерело живлення, блотинг-модуль та компоненти «сендвіча», що входять до системи Mini-

protean Tetra Handcast Systems фірми «Bio-Rad» виробництва США. Блотинг проводили в буфері, що готували за наступним прописом (на 1 л): 2,93 г гліцину («Carl Roth», США), 5,82 г Tris, 0,01% СДС (додецилсульфат натрію) та 200 мл спирту 96% («Завод хімічних реактивів», Україна). Буфер для розведення зразків готували з використанням ФСБ, 0,05% TWEEN 20 та 1% кролячої чи козячої сироватки («Sigma-Aldrich», США), залежно від типу антитіл. Трансфер ЛПС чи білків під час блотингу проводили на нітроцелюлозну мембрану Novex Nitrocellulose Pre-cut Blottin Membranes («Invitrogen», США). У реакції використовували поліклональні IgG вторинні антитіла Rabbit-anti-Pig, HRP («Thermo Fisher Scientific», США) для детекції антитіл у свинячих сироватках, поліклональні IgG вторинні антитіла Goat-anti-human, HRP («Thermo Fisher Scientific», США) для детекції антитіл у людських сироватках та Anti-Strep-Tag II, HRP антитіла (ІВА, Німеччина) для перевірки рекомбінантних білків. Для візуалізації смуг на мембрані додавали субстрат SeramunBlau TMB («Seramun», Німеччина).

#### **2.1.10. Матеріали для екстракції нуклеїнових кислот**

Екстракцію ДНК збудника туляремії з польового матеріалу проводили методом афінної сорбції [81, 89] з власною модифікацією – використанням SDS-лізуючого буферу. Роботи проводили у шафі біологічної безпеки 2 класу виробництва «ESCO», Сінгапур.

Для проведення екстракції готували наступні розчини:

1) для приготування СДС-лізуючого буферу змішували 5 мл 1М Tris-HCl (pH8.0), 4 мл 5М NaCl; 20 мл 0,5М EDTA; 10 мл 10% СДС та доводили загальний об'єм дистильованою водою, вільною від нуклеаз до 100 мл;

2) для приготування лізуючого буферу змішували 24 г гуанідину тіоціонату («Sigma-Aldrich», США), 20 мл 0,1 М Tris-HCl (pH 6,4), 4,4 мл 0,2 М EDTA (pH 8,0), 0,5 мл Triton X-100 та нагрівали до 60°C;

3) для приготування сорбенту до мірної колби вносили 6 г SiO<sub>2</sub>, («Sigma-Aldrich», США), доводили об'єм дистильованою водою, вільною від нуклеаз, до 50 мл, ретельно перемішували і залишали на 24 години. Після закінчення часу видаляли 43 мл надосадової рідини і знову доводили об'єм, що залишився, дистильованою водою, вільною від нуклеаз, до 50 мл. Після цього ретельно перемішували і залишали ще на 8 годин. Після утворення осаду видаляли 44 мл надосадової рідини; додавали 60 мкл HCl та перемішували;

4) для приготування розчину для відмивки 1 змішували 24 г гуанідину тіоціонату, 20 мл 0,1 М Tris-HCl (pH 6,4), 4,4 мл 0,2 М EDTA (pH 8,0) «Serva» (США) та нагрівали до 60 С;

5) для приготування розчину для відмивки 2 змішували 73,68 мл 95 % етилового спирту, 0,25 мл 4 М NaCl («Завод хімічних реактивів», Україна) і доводили обсяг дистильованою водою, вільною від нуклеаз, до 100 мл;

6) для приготування розчину для фінальної відмивки змішували 33,3 мл ізопропанолу і 16,7 мл хлороформу («Sigma-Aldrich», США).

### **2.1.11. Матеріали для проведення ампліфікації**

Реакцію ампліфікації проводили з використанням полімерази та комплекту компонентів AmpliTaq Gold 360 («Applied Biosystems», США). Ампліфікацію у режимі реального часу проводили за допомогою термоциклера FAST 7500 («Applied Biosystems», США), ампліфікацію при проведенні класичної ПЛР проводили за допомогою термоциклера «BioMetra» (Німеччина).

### **2.1.12. Матеріали для проведення горизонтального електрофорезу**

Для проведення електрофоретичного аналізу використовували 1,5 % гель, виготовлений з ME-агарози виробництва фірми «Biozym» (Німеччина). Для приготування TAE буферу застосовували бромистий етидій виробництва фірми «Sigma-Aldrich Ltd.» (США), EDTA, Tris та оцтову кислоту виробництва фірми «Serva» (США). У роботі використовували маркери молекулярної маси «Quick load 100 bp purple DNA-ladder» («Thermo Fisher Scientific», США).

Електрофорез у агарозному гелі проведений в електрофоретичній камері Sub Cell з наступною візуалізацією результатів в УФ-світлі в транслюмінаторі Gel Doc XR фірми «Biorad» (США).

### **2.1.13. Матеріали для молекулярного клонування рекомбінантного позитивного контролю**

Для створення рекомбінантного позитивного контролю в якості вектору використовували плазмиду pTZ57R/T з комерційного набору «Ins TA clone PCR Cloning Kit» (Fermentas, Литва). Лігіювання ампліконів до плазмід та трансформацію клітин *E. coli* DH5a плазмідною ДНК здійснювали за допомогою комерційного набору «Ins TA clone PCR Cloning Kit» (Fermentas, Литва). Для вирощування трансформованих культур клітин *E. coli dh5a* використовували рідке та тверде поживне середовище LB (Лурія-Бертані) виробництва фірми «Sigma» (США). Скринінг необхідних колоній проводили за методом блакитно-білої трансформації з використанням X-Gal і IPTG виробництва («Sigma-Aldrich», США) на твердому поживному середовищі LB [90]. Плазмідна ДНК була екстрагована з рекомбінантних культур клітин *E. coli* за допомогою комерційного набору «Plasmid Miniprep Kit» («GeneJET», Литва). Для екстракції ампліконів з агарозного гелю застосовували комерційний набір «Gel Extraction Kit» («Thermo Fisher Scientific», США).

Секвенування плазмід проводили в компанії Eurofins BioPharma Product Testing (Мюнхен, Німеччина).

#### **2.1.14. Матеріали для молекулярного клонування рекомбінантних антигенів**

Очищення ПЛР-продуктів проводили за допомогою набору Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (NEB, Великобританія). У роботі були використані ферменти, а саме IIS рестриктаза *ESP31*, T4-ДНК-лігаза, Q5 ДНК-полімераза та буферні системи для вказаних ензимів виробництва фірми «NEB» (Великобританія). Для проведення клонування був використаний вектор Star Gate IBA pASG-103 (IBA, Німеччина). Для вирощування трансформованих культур клітин *E. coli* використовували рідке та тверде поживні середовища LB (Лурія-Бертані) виробництва фірми «Sigma-Aldrich» (США). Скринінг необхідних колоній проводили за методом блакитно-білої трансформації з використанням X-Gal виробництва фірми «Sigma-Aldrich» (США). Плазмідна ДНК була екстрагована з рекомбінантних культур клітин *E. coli* за допомогою комерційного набору «Plasmid Miniprep Kit» («GeneJET», Литва). Секвенування плазмід проводили в компанії Eurofins BioPharma Product Testing (Мюнхен, Німеччина).

#### **2.1.15. Праймерні системи, використані під час проведення досліджень**

У роботі наведена низка праймерних систем, що використовувались для детекції збудника туляремії, а також для побудови і перевірки рекомбінантних конструкцій, описані в доступній науковій літературі чи розроблені самостійно (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

## Системи праймерів, використані при виконанні дисертаційної роботи

Назва праймеру	Послідовності олігонуклеотидів (праймерів), 5' → 3'	Таргетний ген	Довжина фрагменту, п.н.	Джерело	Використання під час роботи
FT-FP F	CAGCATACAATAATAA CCCACAAGG	<i>tul4</i>	103	Gregory S. Buzard, 2012 [72]. Рекомендовано ВООЗ [7]	Розробка рекомбінантного позитивного контролю. Скринінг зразків щодо <i>F.tularensis</i> у ПЛР
FT-FP R	TCAGCATACTTAGTAA TTGGGAAGC				
FT-FP P	TTACAATGGCAGGCTC CAGAAGGTT				
Fran16S F	GAGCGCAACCCCTATTG TA	<i>16S</i>	184	Власна розробка сумісно з ІМБ. Рекомендовано ВООЗ [7]	Скринінг зразків щодо <i>F.tularensis</i> у ПЛР
Fran16S R	TTTTGAGTTTTCGCTCCA GCT				
Fran16S P	CTATTGAGACTGCCGCTg ACAAGGC				
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	Контролювання побудови і трансформації плазмід [91]			
M13R	CAGGAAACAGCTATTG AC				
GroEl F	AGCGCGTCTCCAATGG CTGCAAAACAAGTTTT ATTTTCAGATG	<i>GroE l</i>	1632	Власна розробка сумісно з ІМБ.	Розробка рекомбінантного ІФА для виявлення антитіл до <i>F.tularensis</i>
GroEl R	AGCGCGTCTCCTCCCC ATCATGCCAGGCATAC CGC				Розробка рекомбінантного ІФА для виявлення антитіл до <i>F.tularensis</i>
FTT 0975 F	AGCGCGTCTCCAATGA AAAAGAGTATTATCCC AATTACTTTAATAAGT	<i>FTT 0975</i>	687	Власна розробка сумісно з ІМБ.	Розробка рекомбінантного ІФА для виявлення антитіл до <i>F.tularensis</i>
FTT 0975 R	AGCGCGTCTCCTCCCTT TCTCCATAAATGTAAC ATTTGCT				Розробка рекомбінантного ІФА для виявлення антитіл до <i>F.tularensis</i>
SucB F	AGCGCGTCTCCAATGG TTGAATTAAAAGTACC TATGTTCC	<i>SucB</i>	1467	Власна розробка сумісно з ІМБ.	Розробка рекомбінантного ІФА для виявлення антитіл до <i>F.tularensis</i>
SucB R	AGCGCGTCTCCTCCCT ACTTGTAGAAGAATTC TATTTGGATCTTC				Розробка рекомбінантного ІФА для виявлення антитіл до <i>F.tularensis</i>

Олігонуклеотидні послідовності були синтезовані фірмою «TIP MOLBIOL» (Німеччина). При виконанні досліджень праймери застосовували у концентрації 10 пМ/мкл.

#### **2.1.16. Матеріали для культивування гібридомних клітин**

Гібридомні клітини-продуценти вторинних антитіл FF27/1/7/POD, що були використані при проведенні конкурентного імуоферментного аналізу, культивували у поживному середовищі RPMI GlutaMax із вмістом 1x NEAA, 1x NaPy, 1x HEPES та 1x  $\beta$ -меркаптоетанолу та 5-10% ФБС («Thermo Fisher Scientific», США). Роботи проводили у ШББ 2 класу виробництва «ESCO», Сінгапур. Клітини культивували в CO<sub>2</sub>-інкубаторі марки Midi 40 («Thermo Fisher Scientific», США). Кріоконсервацію клітин проводили з додаванням до поживного середовища 30% ФБС, 10% ДМСО («Завод хімічних реактивів», Україна) у кріопробірках об'ємом 2 мл виробництва «CryoKing», Китай за температури мінус 70°C (низькотемпературний морозильник Forma 8600, «Thermo Fisher Scientific», США.) та мінус 195,75 °C (сосуд Дьюара X-34БМ з рідким азотом, виробник «ХЗТО», Україна).

#### **2.1.17. Матеріали для проведення хроматографічної очистки антигенів та антитіл**

Хроматографічну очистку проводили з використанням системи високоефективної рідинної хроматографії Akta Pure. Обробку зразків ультразвуком проводили в ультразвуковій бані.

##### *Матеріали для очищення рекомбінантних протеїнів*

Для проведення очищення рекомбінантних протеїнів використовували афінну хроматографічну колонку Tactin XT (ІВА, Німеччина)



Буфери для хроматографії готували із наступних компонентів (вказані фінальні концентрації у розчині):

Буфер W: 100мМ Tris-HCL, рН 8.0, 150мМ NaCl, 1мМ EDTA;

Буфер для елюції ВХТ: 100мМ Tris-HCL, рН 8.0, 150мМ NaCl, 1мМ EDTA, 50мМ біотин («Sigma-Aldrich», США).

*Матеріали для очищення вторинних антитіл FF27/1/7/POD*

Для проведення очищення вторинних антитіл FF27/1/7/POD використовували афінну хроматографічну колонку HiTrap Protein L (GE Healthcare, США).

Буфери для хроматографії готували із наступних компонентів (вказані фінальні концентрації у розчині):

Зв'язуючий буфер: 20мМ Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150мМ NaCl, рН 7,2;

Буфер для елюції: 0,1М Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> («Sigma-Aldrich», США), рН 2,0-3,5.

Антитіла кон'югували з HRP-мітками за допомогою комерційного набору EZ-link Pluse Activated Peroxidase kit (Thermo Fisher Scientific, США).

### **2.1.18. Програмне забезпечення**

Підбір праймерів проводили за допомогою комп'ютерної програми AmplyfiX 1.0 та Primer2.

Аналізування сиквенсів проводили в програмі BioEdit.

Дизайн та теоретичний аналіз плазмідного вектору здійснено в програмному пакеті Clone Manager 7.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми PAST 3.

Географічне розташування місць відбору зразків картували за допомогою програми qGIS 2.6.1.

Аналіз отриманих даних після MLVA проводили за допомогою програмного забезпечення GeneMapper ver. 3.5 (Applied Biosystems, США) та Bionumerics (Applied Maths, США).

## **2.2. Методи проведення досліджень**

### **2.2.1. Культивування вакцинного штаму *F.tularensis* 15Г**

Для отримання ліпополісахаридів культивування вакцинного штаму *F.tularensis* 15Г проводили у 25 мл мізково-глюкозо-серцевого бульйону, в термошейкері, при 150 об./хв. та 37°C впродовж 48 годин. Перед початком виділення оптична щільність культури мала становити 0,8-1,2. Для виділення відбирали 10 мл рідкої культури, відкручували на центрифугі при 7000 об/хв впродовж 10 хв. Проводили виділення ЛПС комерційним набором згідно інструкцій виробника. Виділені ЛПС аліквотували та зберігали за температури мінус 20°C.

Для підтримання культури вакцинний штам пересівали на твердому цистеїново-серцевому поживному середовищі із додаванням 10% жовтої емульсії. Культивування проводили в інкубаторі за температури 37°C впродовж 48 годин. Культуру зберігали за температури 4°C не довше трьох місяців.

### **2.2.2. Методика проведення MLVA-генотипування**

Генотипуванню передувало проведення класичної ПЛР, для якої готували 4 мастермікси за протоколом виробника Quiagen Multiplex PCR Mix. Праймерні системи були скомпоновані наступним чином: мастермікс 1 (Ft-M22, FT-M03, FT-M23, Ft-M24), мастермікс 2 (Ft-M20A, FT-M10, FT-M05, Ft-M26), мастермікс 3 (Ft-M04, FT-M20B, FT-M06), мастермікс 4 (FT-M02). ПЛР проводили за наступним протоколом (таблиця 2.3)

Таблиця 2.3

Проведення ампліфікації MLVA-локусів *F.tularensis*

Режими ампліфікації			
Етап	Температура	Час	Кількість циклів
1	95 °C	15 хв	1
2	94 °C	30 хв	40
	60 °C	90 хв	
	72 °C	90 хв	
3	60 °C	30 хв	1

Перед проведенням MLVA-генотипування, отримані амплікони розводили 1:100. До 2 мкл розведеного амплікону додавали 17,5 мкл формаміду та 0,5 мкл внутрішнього контролю, після чого проводили безпосередньо генотипування методом визначення довжини ампліконів у капілярному електрофорезі за допомогою прибору GeneScan-1200 LIZ, POP-7.

### 2.2.3. Методи збору та транспортування зразків для досліджень

Було проведено збір польового матеріалу (іксодові кліщі, хвости мишовидних гризунів, пелети) у Харківській, Дніпровській та Миколаївській областях.

Кліщі сімейства *Ixodidae* збирали на флаг розміром 0,6 x 1 м. Види та їх стать були виявлені за допомогою класифікатора видів [92]. Кліщів вміщували у пробірки типу Еппендорф разом зі змоченим у воді шматочком вати чи частинкою трави для зберігання достатнього рівня вологи у пробірці. Зразки доставляли до лабораторії за кімнатної температури.

Мишовидних гризунів відловлювали з використанням пасток Геро протягом 400 пастко-днів. Пастки розташовували в лісах, заплавах, полях та інших місцях для отримання високого біорізноманіття. Від гризунів відбирали

весь хвіст або (1-2) мм його більш товстої частини і вміщували у 1,5 мл пробірки типу Еппендорф з 500 мкл лізуючого СДС-буферу (50 мМ Tris-HCl рН 8,0; 200 мМ NaCl; 100 мМ EDTA; 1% СДС). Після цього, пробірки доставляли до лабораторії у термоконтейнері з охолоджуючими елементами.

Совині пелети збирали неподалік від місць проживання сов або безпосередньо з дупел, фасували у паперові пакети і доставляли до лабораторії за кімнатної температури. Крім того, збирали і інші зразки з навколишнього середовища (вода, сіно).

#### **2.2.4. Методика проведення конкурентного ІФА з використанням ліпополісахаридних антигенів**

Для дослідження сироваток від диких кабанів на наявність антитіл до *F.tularensis* використовували *in house* конкурентний імуоферментний аналіз, розроблений спільно з Інститутом мікробіології Бундесверу (м. Мюнхен, Німеччина). Аналіз проводили згідно з наступним протоколом:

- 1) ліпополісахаридний антиген розводили у карбонатному буфері (рН 9,0) до фінальної концентрації 1 мг/мл, перемішували і вносили по 50 мкл у лунки планшету;
- 2) планшет накривали плівкою та інкубували за температури 4°C впродовж 1-5 діб;
- 3) лунки відмивали 200 мкл відмивочного розчину (0,05% TWEEN, розчинений у ФСБ), після чого реакцію блокували блокуючим розчином (10% знежиреного молочного порошку, розчиненого у ФСБ), потім планшет інкубували за температури 37°C впродовж 1 години;
- 4) планшети спустошували, сироватки та контрольні зразки розводили у співвідношенні 1:25 буфером для розведення (10% знежиреного

молочного порошку, розчиненого у відмивочному буфері) та вносили по 100 мкл у лунки.;

- 5) планшети відмивали 4 рази відмивочним буфером;
- 6) конкурентні антитіла FF27/1/7/POD розводили у співвідношенні 1:2000 буфером для розведення та вносили по 50 мкл до кожної лунки;
- 7) інкубацію проводили за температури 37 °C впродовж 20 хвилин;
- 8) планшети відмивали 4 рази відмивочним буфером;
- 9) до кожної лунки додавали 50 мкл субстрату ТМБ з однаковою швидкістю;
- 10) інкубацію проводили в темряві за кімнатної температури протягом (20-30) хвилин;
- 11) реакцію зупиняли, додаючи 50 мкл 0,25 М розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, та досліджували оптичну щільність зразків за допомогою ІФА-рідера.

Аналіз кожного зразка проводили у двох повторах. Аналіз позитивного та негативного контролів проводили у трьох повторах.

При аналізі показників було вираховане середнє значення для трьох повторів негативного контролю та їх стандартне відхилення. Порогове значення визначали за формулою:

$$\text{Порогове значення} = \text{середнє значення} - (\text{стандартне відхилення} \times 3)$$

Всі зразки, що мали оптичну щільність нижче порогового значення, вважали позитивними.

### **2.2.5. Методика проведення непрямого ІФА з використанням рекомбінантних антигенів**

- 1) протеїнові антигени розводили і титрували у карбонатному буфері (рН 9,5) та додавали по 50 мкл у лунки планшету;

2) планшет накривали плівкою та інкубували за температури 4°C впродовж 24 годин;

3) лунки відмивали 200 мкл відмивочного розчину (0,05% TWEEN, розчинений у ФСБ) після чого реакцію блокували блокуючим розчином (10% знежиреного молочного порошку, розчиненого у ФСБ), потім планшет інкубували за температури 37°C впродовж 1 години;

4) планшети спустошували, сироватки та контрольні зразки розводили і титрували буфером для розведення (10% знежиреного молочного порошку, розчиненого у відмивочному буфері) та додавали по 100 мкл у лунки, потім планшет інкубували за кімнатної температури впродовж 2 годин;

5) планшети відмивали 4 рази відмивочним буфером;

6) вторинні антитіла IgG rabbit-anti-Pig, при дослідженні зразків від кабанів та свиней розводили у співвідношенні 1:2000, IgG goat-anti-Human, при дослідженні зразків від людей розводили у співвідношенні 1:5000 буфером для розведення з 1% кролячої (для дослідження зразків від свиней) чи козячої (для дослідження зразків від людей) сироватки та додавали по 50 мкл суміші до кожної лунки;

7) інкубацію проводили за температури 37°C впродовж 1 години;

8) планшети відмивали 4 рази відмивочним буфером;

9) до кожної лунки додавали 50 мкл субстрату ТМБ з однаковою швидкістю;

10) інкубацію проводили в темряві за кімнатної температури протягом (20-30) хвилин;

11) реакцію зупиняли, додаючи 50 мкл 0,25 М розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, та досліджували оптичну щільність зразків за допомогою ІФА-рідера.

При аналізі показників було враховане середнє значення для трьох повторів негативного контролю та їх стандартне відхилення. Порогове значення визначали за формулою:

Порогове значення = середнє значення + (стандартне відхилення × 3)

Всі зразки, що мали оптичну щільність нижче порогового значення, вважали позитивними.

При проведенні титрування антигенів та сироваток, визначали внутрішньосистемний коефіцієнт варіативності (Intra CV) за наступною формулою:

$$\text{Intra CV} = \frac{\text{стандартне відхилення}}{\text{середнє значення}} \times 100\%$$

Результати аналізу вважали достовірними, якщо внутрішньосистемний коефіцієнт варіативності не перевищував 10%

Також, для підтвердження достовірності результатів визначали міжсистемний коефіцієнт варіативності (Inter CV) за наступною формулою:

$$\text{Inter CV} = \frac{\text{середнє значення стандартних відхилень повторів у різних планшетах}}{\text{середні значення повторів у різних планшетах}} \times 100\%$$

Чутливість та специфічність ІФА визначали за наступними формулами:

$$\text{Чутливість} = \frac{П}{П+ХН} \times 100\%; \text{ де}$$

П= кількість підтверджених позитивних результатів, ХН – кількість хибно негативних результатів

$$\text{Специфічність} = \frac{Н}{Н+ХП} \times 100\%; \text{ де}$$

Н= кількість підтверджених негативних результатів, ХП – кількість хибно позитивних результатів

### 2.2.6. Методика проведення Вестерн-блотингу

Згідно з рекомендаціями ВООЗ, для підтвердження результатів конкурентного імуноферментного аналізу використовували методику Вестерн-блотингу. Аналіз проводили згідно з наступним протоколом [69]:

- 1) готували суміш із 10 мкл ЛПС з концентрацією 240 мкг/мл, 3 мкл 4x Лаеммі-буферу та 7 мкл 1М ДТТ;
- 2) термостатували зразки за температури 95°C впродовж 5 хвилин;
- 3) перемішували зразки та інкубували їх впродовж 2 хвилин на льоду;
- 4) додавали 15 мкл суміші ЛПС до кожного карману ПААГ (поліакриламідний гель);
- 5) проводили вертикальний електрофорез у електрофорезному буфері за напруги 200В протягом 1,5 годин;
- 6) замочували всі компоненти блотинг-сендвічу (фільтрувальний папір, нітроцелюлозну мембрану, губки) у трансфер-буфері на (10-15) хв.;
- 7) складали блотинг-сендвіч, в середині якого розташовували нітроцелюлозну мембрану та ПААГ, а фільтрувальні папери та губки - із зовнішніх боків. Всі компоненти поміщали в блотинг-касету для забезпечення щільного прилягання мембрани до ПААГ;
- 8) переносили ліпополісахариди з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану у спеціальній камері з трансфер-буфером та охолоджуючим елементом за напруги 100 В протягом 1г 15 хв;
- 9) блокували мембрану з ЛПС у блокуючому буфері (10 % молока + ФСБ) протягом 1 години за кімнатної температури, чи за температури 4°C протягом ночі;
- 10) видаляли блокуючий буфер та інкубували нітроцелюлозну мембрану з первинними антитілами (свиняча сироватка), розведеними у співвідношенні 1:500 у 10 мл відмивочного буферу;



11) відмивали мембрану 1-2 рази відмивочним буфером, третій раз мембрану відмивали відмивочним буфером протягом 10 хв.;

12) інкубували мембрану HRP-вторинними антитілами, розведеними у співвідношенні 1:2500 (IgG anti-Pig, при дослідженні зразків від кабанів та свиней, IgG anti-Human, при дослідженні зразків від людей; у співвідношенні 1:2000 FF27/1/7/POD при перевірці очищення та кон'югації антитіл) у 10 мл відмивочного буферу протягом 45 хв за кімнатної температури;

13) відмивали мембрану 1-2 рази відмивочним буфером, третій раз мембрану відмивали відмивочним буфером протягом 10 хв.;

14) відмивали мембрану ФСБ один раз;

15) інкубували мембрану протягом 10 хв. у 5-7 мл ТМВ у темряві;

16) зупиняли реакцію зливанням ТМВ і відмиванням мембрани 1 раз дистильованою водою;

17) підсушували мембрану та проводили облік результатів.

### **2.2.7. Метод екстракції нуклеїнових кислот**

Екстракцію ДНК *F.tularensis* здійснювали сорбентним методом заснованим на принципі афінної сорбції [81], [89] з власною модифікацією, що заключається у використанні двох лізуючих буферів (СДС-лізуючий буфер, та лізуючий буфер з гуанідином тіоціанатом) для покращення лізису біологічного матеріалу від гризунів. В залежності від типу матеріалу, проводили належну пробопідготовку.

#### *Пробопідготовка кліщів перед екстракцією НК.*

Кліщів поміщали в пробірках типу Еппендорф за температури мінус 70 С протягом 30 хвилин, після чого їх транспортували до лабораторії. До еппендорфу додавали 200 мкл фізіологічного розчину за кімнатних умов.

Кліщів розтирали стерильною гострою скляною паличкою, вортексували та використовували рідинну фазу для подальшого виділення нуклеїнових кислот.

*Пробопідготовка хвостів гризунів перед екстракцією НК.*

Перед екстракцією НК хвости гризунів гомогенізували наступним чином. До пробірки з матеріалом в СДС-лізуючому буфері додавали 15 мкл протеїнази К (20 мг/мл). Зразки інкубували за температури 55°C і періодично вортексували до розчинення хвоста у буфері. Після лізису зразки центрифугували за 13000 об/хв протягом 5 хвилин. Супернатант відбирали та використовували для екстракції нуклеїнових кислот.

Екстракцію нуклеїнових кислот проводили за наступним протоколом:

1. До пробірок типу епендорф вносили по 300 мкл лізуючого розчину.
2. До пробірок з лізуючим розчином додавали по 100 мкл досліджуваного зразку (чи супернатанту після проведеної пробопідготовки), ретельно перемішували на вортексі.
3. Зразки прогрівали при 65°C протягом 5-10 хв.
4. До кожної пробірки додавали по 25 мкл сорбенту, ретельно перемішували на вортексі. Інкубували 1 хв. при кімнатній температурі, перемішували на вортексі.
5. Інкубували 5 хв. при кімнатній температурі.
6. Центрифугували пробірки при 10000 об/хв. впродовж 30 секунд.
7. Видаляли надосадову рідину, додавали 300 мкл розчину для відмивання 1. Ретельно ресуспендували сорбент на вортексі.
8. Центрифугували пробірки при 10000 об/хв. впродовж 30 секунд.
9. Видаляли надосадову рідину, додавали по 500 мкл розчину для відмивання 2. Ретельно ресуспендували сорбент на вортексі.
10. Центрифугували пробірки 30 секунд при 10000 об/хв.
11. Повторювали п. 9-10.

12. Видаляли надосадову рідину, додавали по 400 мкл розчину для фінального відмивання 3. Ретельно ресуспендували сорбент на вортексі.

13. Центрифугували пробірки при 10000 об/хв. впродовж 30 секунд.

14. Ретельно видаляли надосадову рідину, інкубували пробірки в твердотільному термостаті з відкритими кришками за температури 65 С до підсушування сорбенту (5-10 хв.).

15. Додавали по 50 мкл TE-буферу, ретельно ресуспендували сорбент на вортексі.

16. Інкубували пробірки в твердотільному термостаті з закритими кришками при температурі 65°C впродовж 5 хвилин, періодично струшуючи на вортексі.

17. Центрифугували пробірки при 13000 об/хв. протягом 60 секунд. Надосадова рідина містила очищені нуклеїнові кислоти, які далі використовувалася в реакції ампліфікації або зберігалися при температурі мінус 70 С.

### **2.2.8. Методи ампліфікації нуклеїнових кислот**

Ампліфікацію нуклеїнових кислот проводили методами класичної ПЛР та ПЛР у режимі реального часу.

#### *Класична полімеразна ланцюгова реакція*

Напрацювання ділянок генів, що кодують білки GroE1, SucB, FTT0975 та перевірку рекомбінантного контролю проводили шляхом ампліфікації зі специфічними праймерами до досліджуваних участків геному *F.tularensis* чи створених плазмід за наступним протоколом (табл. 2.4)[9], [23], [24], [91].

ПЛР проводили в програмному термостаті (ампліфікаторі) за наступною програмою (табл. 2.5).

Таблиця 2.4.

**Пропис приготування реакційної суміші для проведення класичної ПЛР**

Реагент	Концентрація Стоковий розчин	Концентрація У фінальному розчині	Кількість мкл на 1 реакцію
Вода деіонізована			13,37
PE-буфер	10 х	1 х	2,5
dNTP Мікс	10 mM кожен	0,2 mM	0,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	1,5
Праймер for	10 μM	0,2 μM	1,0
Праймер rev	10 μM	0,2 μM	1,0
Полімераза AmpliQa Gold	5 U/μl	1,25 U/50μl	0,13
Загальний об'єм мастерміксу			20,0
Кількість ДНК			5
Загальний об'єм реакційної суміші			25

Таблиця 2.5

**Ампліфікаційні цикли для накопичення генів GroE1, SucB, FTT та M-13*****F.tularensis* методом класичної ПЛР**

Праймерні системи	Режими ампліфікації				Фінальна елонгація
	Первинна денатурація	Денатурація	Відпал	Елонгація	
M13	95°C – 1 хв.	96°C-30 с	55°C-20 с.	72°C-1 хв.	72°C-5 хв.
	1 цикл	40 циклів			1 цикл
GroE1	98 °C – 30 с.	98 °C – 10 с.	72 - 30 с	72°C –70с	72°C – 4 хв.
	1 цикл	35 циклів			1 цикл
FTT	98 °C – 30 с.	98 °C – 10 с.	58°C - 20 с	72°C – 30 с.	72°C – 2 хв.
	1 цикл	35 циклів			1 цикл
SucB	98 °C – 30 с.	98 °C – 30 с.	56°C - 15 с	72°C – 50 с.	-.
	1 цикл	10 циклів			-
	-	98 °C – 10 с.	72°C - 65 с	-	72 – 2 хв.
	-	20 циклів			1 цикл

*Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі*

Напрацювання ампліконів частини рибосомального гену 16S та генів, що кодують білок *tul4*, проводили шляхом ампліфікації у режимі реального часу зі специфічними праймерами та зондами до досліджуваних участків геному *F.tularensis* (табл. 2.1.)[23], [24], [91].

У реакції ампліфікації використовували полімеразу і набір компонентів AmpliTaq Gold 360 за наступним протоколом (табл. 2.6):

Таблиця 2.6

**Пропис приготування реакційної суміші для проведення ПЛР у режимі реального часу**

<b>Реагент</b>	<b>Концентрація Стоковий розчин</b>	<b>Концентрація У фінальному розчині</b>	<b>Кількість мкл на 1 реакцію</b>
Вода деіонізована			12,72
PE-буфер	10 x	1 x	2,5
dNTP Мікс	10 mM кожен	0,2 mM	0,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	1,5
Праймер for	10 μM	0,2 μM	1,0
Праймер rev	10 μM	0,2 μM	1,0
Зонд	10 μM	0,2 μM	0,5
Полімераза AmpliTaq Gold	5 U/μl	1,25 U/50μl	0,13
ROX	5 μM	0,03 μM	0,15
Загальний об'єм мастерміксу			20,0
Кількість ДНК			5
Загальний об'єм реакційної суміші			25

ПЛР проводили в програмному термостаті (ампліфікаторі) за наступною програмою (табл. 2.7).

Таблиця 2.7

**Ампліфікаційні цикли для накопичення генів *tul4* та *16S F.tularensis* методом ПЛР у режимі реального часу**

Праймерні системи	Режими ампліфікації				
	Первинна денатурація	Денатурація	Відпал	Елонгація	Фінальна елонгація
FT-FP	95 °C – 5 хв.	95 °C – 10 с.	60°C - 30 с	72°C – 40 с.	72°C – 1 хв.
	1 цикл	40 циклів			1 цикл
Fran16S	95 °C – 5 хв.	95 °C – 15 с.	58°C - 30 с	72°C – 40 с.	72°C – 1 хв.
	1 цикл	40 циклів			1 цикл

### 2.2.9. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР

Аналіз продуктів ПЛР проводили методом горизонтального геле-електрофорезу з метою виявлення продуктів ампліфікації та встановлення відповідності їх розмірів, а також розподілення фрагментів рестрикції після обробки рестрикційними ендонуклеазами при створенні рекомбінантного позитивного контролю.

Електрофорез проводили з використанням агарозного гелю з фарбуванням бромістим етидієм у кінцевій концентрації 0,3 мкг/мл. Концентрація агарози у гелі при цьому становила 1,5 %.

Для приготування 1,5 % агарозного гелю до кінчної колби ємністю 250 см<sup>3</sup> вносили 1,5 г агарози, додавали 100,0 мл ТАЕ буфера та ставили колбу у мікрохвильову піч. Вміст колби доводили до кипіння та повністю

розтоплювали. Після охолодження розплавленої агарози до температури  $(55\pm 5)^\circ\text{C}$  до неї вносили 30,0 мкл розчину броміду етидія і переміщували до камери для заливання гелів з гребінками. Після застигання агарози обережно виймали гребінки та переносили платформу з агарозним гелем до електрофоретичної камери, до якої заливали необхідну кількість розчину ТАЕ-буферу таким чином, щоб він покривав гель шаром завтовшки (4-5) мм. Продукти ампліфікації вносили у відповідні лунки агарозного гелю у кількості 10 мкл. Електрофорез проводили у градієнті напруги 100 В/см впродовж 40 хвилин.

Облік результатів електрофорезу проводили з використанням трансільюмінатору в пронизуючих УФ-променях з довжиною хвилі 310 нм. Фрагменти, що утворилися, виявляли у вигляді смужок, довжину яких визначали за порівнянням з відповідними фрагментами маркеру молекулярної маси.

#### **2.2.10. Методика отримання рекомбінантного позитивного контролю**

З метою конструювання плазмідного контролю, напрацьовані за допомогою ПЛР ділянки гену *tul4* збудника туляремії були екстраговані з гелю за допомогою комерційного набору «GeneJet Gel Extraction kit» згідно інструкції виробника. Екстраговані продукти ампліфікації вбудовували шляхом лігювання до плазмідного вектору pTZ57R/T з використанням комерційного набору «Ins TA clone PCR Cloning Kit». Для цього 10 мкл ПЛР продукту змішували з 3 мкл плазмідної ДНК ТА-вектору та 1 мкл Т4 ДНК лігази. Отриману реакційну суміш інкубували за  $4^\circ\text{C}$  впродовж 16 годин з метою лігювання донорної та векторної ДНК.

Хімічну трансформацію бактерій *E. coli* штаму DH5a для інтеграції рекомбінантного вектору проводили з використанням компетентних клітин, завчасно підготовлених за методикою Chang A. та співавторів [93]. Далі, до 50 мкл підготовлених компетентних клітин *E. coli* штаму DH5a додавали 2,5 мкл лігазної суміші та витримували 5 хв. на льоду. Після чого трансформовані клітини *E. coli* штаму DH5a висівали як на чашки, так і у рідке середовище з LB-агаром з додаванням ампіциліну (100 мкг/мл) та інкубували в шейкері-інкубаторі за температури 37 °С. Для контролю лігації проводили блакитно-білий скринінг з додаванням до чашок Петрі, окрім ампіциліну, IPTG (50 мг/мл) та X-Gal (50 мг/мл), після чого обирали для подальших досліджень лише білі колонії.

Скринінг трансформованих бактеріальних колоній щодо наявності рекомбінантних плазмід проводили за допомогою ПЛР з використанням праймерних систем FT-FP\_F/R та M13\_F/R.

Для очищення плазмідної ДНК з рекомбінантної культури клітин *E. coli* був використаний комерційний набір «Plasmid Miniprep Kit» згідно інструкції виробника.

### **2.2.11. Методика отримання рекомбінантних антигенів**

Для створення рекомбінантних антигенів були обрані три протеїни *F.tularensis*, що мають антигенні властивості: 2-оксоглутаратдегідрогеназа, компонент E2, дигідроліпоамід сукцинилтрансферази (SucB), шаперон 60 (GroE1) та потенційний протеїн FTT0975 [94]. Амплікони для вказаних протеїнів напрацьовували з використанням специфічних праймерних систем та компонентів ПЛР за температурних умов, вказаних у таблицях 2.2, 2.4., 2.5., після чого продукти ПЛР очищували набором Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit згідно з інструкцією виробника.



Рестрикційний аналіз та лігацію проводили одночасно і для кожного протеїну окремо з використанням рестриктази *ESP31*. Для цього робили суміш, до якої додавали 5 нг вектору Strep-tag pASG103, 25 нМ отриманого амплікону, 2,5 мкл буферу для рестриктази, 1 мкл ДТТ/АТФ-суміші, 1U T4-ДНК-лігази та 5U рестриктази, суміш доводили до кінцевого об'єму 25 мкл деіонізованою водою та інкубували в твердотільному термостаті за 30°C протягом 1 години.

Трансформацію проводили з використанням 50 мкл компетентних клітин *E.coli* TOP10 та 10 мкл реакційної суміші після рестрикції. Після 30 хв. інкубування суміші клітин *E.coli* з реакційною сумішшю на льоду в одній пробірці, проводили реакцію теплового шоку, інкубуючи суміш протягом 5 хв. за 37°C, після чого її знов охолоджували на льоду протягом 5 хв. До пробірки додавали 500 мкл поживного бульйону LB та інкубували в термошейкері упродовж 1 години при 37°C та 200 об./хв. Отримані трансформовані клітини висівали на чашки Петрі з середовищем LB, що містив 100 мг/л карбеніциліну та 50 мг/л X-Gal, та інкубували упродовж 24 годин за 37°C.

Для перевірки отриманих трансформованих клітин обирали лише білі колонії та проводили класичну ПЛР з тими ж праймерними системами, що використовувались при напрацюванні ампліконів. Позитивні колонії культивували в поживному бульйоні LB з карбеніциліном (100 мг/л) упродовж 24 годин за 37°C та проводили екстракцію плазмід з рекомбінантної культури клітин *E. coli* комерційним набором «Plasmid Miniprep Kit» згідно інструкції виробника. Отримані плазміди секвенували для перевірки правильності послідовностей та рамки зчитування лігovanого ПЛР-продукту.

Плазміди, що мали правильні лігovanі послідовності, дали трансформували у компетентні експресуючі клітини *E.coli* BL21L при 42°C протягом 45 с. Отримані клони висівали на чашки Петрі з LB та

карбеніциліном (100 мг/л) на 24 години за 37°C та використовували для проведення індукції протеїну. Чашки зберігали при плюс 4°C.

Для проведення індукції створювали 24-годинну культуру отриманих клонів у LB-середовищі з карбеніциліном за 37°C. Наступного дня, 24-годинну культуру розводили у LB-бульйоні з карбеніциліном у співвідношенні 1:25 та культивували до отримання оптичної щільності культури 0,6-0,8, після чого до культури додавали ангідротетрациклін (200 нг/мл), що ініціює індукцію протеїну, та залишали у термошейкері за 37°C на 3-6 годин. Після закінчення індукції клітини відкручували у центрифугі при 5000 об./хв. протягом 10 хв та зберігали за температури мінус 20°C для подальшої хроматографічної очистки напрацьованих протеїнів.

#### **2.2.12. Методика пересіву гібридомних культур та напрацювання антитіл FF27/1/7/POD**

Для напрацювання антитіл FF27/1/7/POD, що використовували у якості кон'югату при проведенні конкурентного імуноферментного аналізу, культивування гібридомних клітин проводили за наступним протоколом:

- 1) клітини переносили із флакону до центрифужної пробірки і відкручували при 300 об./хв. протягом 10 хв.;
- 2) до флакону додавали готове середовище RPMI з 5% інактивованої фетальної сироватки ВРХ;
- 3) супернатант зливали, осад ресуспендували у 5 мл вищевказаного середовища RPMI з 5% інактивованої фетальної сироватки ВРХ;
- 4) ресуспендований осад додавали до флакону із залишком середовища;
- 5) клітини інкубували у CO<sub>2</sub>-інкубаторі при вологості 100%, за температури 37°C і 5% CO<sub>2</sub> протягом 3-4 днів;

6) після інкубації до флакону додавали другий об'єм готового середовища RPMI без фетальної сироватки і інкубація продовжувалась протягом наступних 2-3 днів;

7) клітини відкривали протягом 10 хв. при 300 об./хв.;

8) отриманий супернатант, що містить антитіла, фільтрували (діаметр пор 0,22 мкм) і зберігали за температури 4°C для подальшої хроматографічної очистки.

Наявність антитіл у супернатанті перевіряли за методом *дот-блоту*:

1) на нітроцелюлозну мембрану наносили 10  $\mu$ л супернатанту у вигляді точки;

2) залишали мембрану для висихання на 5-10 хв.;

3) блокували мембрану в 10 мл блокуючого буферу (5% молока у ФСБ) впродовж години за кімнатної температури;

4) тричі відмивали мембрану ФСБ з 0,05% TWEEN, кожен раз впродовж 5 хв.;

5) інкубували мембрану протягом 10 хв. у субстраті TMB.

### **2.2.13. Методика хроматографічної очистки рекомбінантних білків та гібридомних антитіл**

Перед хроматографічною очисткою проводили дегазацію всіх розчинів, включаючи зразок, протягом 24 годин, а також дегазацію системи хроматографічної очистки Акта.

#### *Методика очистки рекомбінантних протеїнів*

Перед хроматографічною очисткою до осаду з індукованими бактеріальними клітинами додавали 20 мл буферу W та проводили їх руйнування в ультразвуковій водяній лазні: клітини піддавали ультразвуковому впливу протягом 30 секунд, після чого робили 30 секунд

перерви, впродовж 40 циклів. Розчин центрифугували за 7000 об/хв. упродовж 5 хвилин та пропускали через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Очистку проводили з використанням афінних колонок Strep-Tactin XT, що промивали буфером W перед початком завантаження зразка.

Зразок завантажували зі швидкістю (0,2-0,5) мл/хв. Після завантаження зразка проводили відмивку буфером W зі швидкістю 0,5 мл/хв. Відмивку закінчували після стабілізації сигналу УФ-детектора за довжини хвилі 280 нм. Елюцію проводили в буфері ВХТ зі швидкістю 0,5 мл/хв, елюйовані фракції збирали та зберігали за температури 4°C.

Для перевірки якості очистки протеїнів вимірювали їх концентрацію та проводили вертикальний електрофорез та вестерн-блотинг зі вторинними Strep-tag антитілами згідно з протоколом виробника Strep-tag колонок.

#### *Методика очистки вторинних антитіл FF27/1/7/POD*

Перед хроматографічною очисткою, отриманий відфільтрований надосад з антитілами розводили у співвідношенні 1:1 зі зв'язуючим буфером.

Очистку проводили з використанням афінних колонок HiTrap Protein L, що промивали зв'язуючим буфером перед початком завантаження зразка.

Зразок завантажували зі швидкістю 1 мл/хв. Після завантаження зразка проводили відмивку зв'язуючим буфером зі швидкістю 0,5 мл/хв. Відмивку закінчували після стабілізації сигналу УФ-детектора за довжини хвилі 280 нм та провідності. Елюцію проводили в лінійному градієнті буфера для елюції від 0% до 100% ВХТ зі швидкістю 1 мл/хв. Елюйовані фракції збирали в пробірках, що містили 60 мкл 1М Tris-HCL, pH 8.0 та зберігали за температури 4°C.

Для перевірки ефективності очистки антитіл, вимірювали їх концентрацію та проводили вертикальний електрофорез. Антитіла кон'югували з HRP-мітками за допомогою комерційного набору EZ-link Pluse Activated Peroxidase kit згідно з протоколом виробника. Перевірку зв'язаних

антитіл проводили за допомогою Вестерн-блотингу з ліпополісахаридами (Розділ 2.1.5) без проведення етапу використання нативних сироваток.

Таким чином, у даному розділі наведено перелік матеріалів (реактиви та обладнання) і методів для розробки рекомбінантних протеїнів та позитивного контролю для виявлення збудника туляремії серологічними та молекулярно-генетичними методами, інструкція з проведення цих методів та отримання гібридомних антитіл для серологічної діагностики туляремії.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Отримання рекомбінантних антигенів для виявлення антитіл до збудника туляремії у сироватках крові свиней і людини

При проведенні серологічних досліджень щодо наявності антитіл до *F.tularensis* в сироватках крові, зазвичай, у якості антигену використовують ліпополісахариди збудника. Для отримання такого антигену необхідно підтримувати в лабораторії живий штам *F.tularensis* чи придбати ЛПС комерційно, що значно збільшує собівартість методу. Тому, при розробці імуноферментного аналізу було вирішено сконструювати рекомбінантні антигени на основі протеїнів *F.tularensis*.

У якості таких антигенів було обрано 3 протеїни *F.tularensis*: FTT0077 - 2-оксоглутаратдегідрогеназа, компонент E2 дигідроліпоамід сукцинилтрансферази (SucB), FTT1696 - шаперон 60 (GroEl) та потенційний протеїн FTT0975. Гени, що кодують ці протеїни, були клоновані до вектору pET26b+. Даний вектор дозволяє отримувати цільові протеїни з 6 HIS-«тагом» на термінальному кінці, що необхідний для проведення очистки методом афінної хроматографії з використанням HIS-trap колонок. Однак, використання такої системи не дозволило отримати протеїни достатньої чистоти, придатної для подальшого проведення непрямого ІФА. Очищені протеїни демонстрували неспецифічний фоновий сигнал під час перевірки методом вестерн-блотингу з негативними сироватками від свиней та людей. Скоріш за все, це було пов'язано з низькоспецифічним зв'язуванням із колонкою інших протеїнів *E.coli*, що мали у складі декілька гістидинових повторів.

Цей експеримент став приводом для проведення повторного клонування цільових протеїнів з іншими векторами, що базувалися на системі

хроматографічного очищення Strep-Tactin®XT Superflow® (IBA, Німеччина) з афінними Twin-Strep-tag®, що склалися із наступних послідовностей амінокислот: WSHPQFEK-GGGSGGGSGG-SA-WSHPQFEK.

Спочатку було вирішено випробувати один цільовий протеїн FTT0975 із наступними векторами: pASG103, pASG105, pPSG103, pPSG 105. Вектор pASG103 містить тетрацикліновий промотор/оператор для індукції експресії протеїнів та Twin-Strep-tag®, що приєднується до рекомбінантного протеїну на С-кінці, а також гени стійкості до ампіциліну. Вектор pASG105 аналогічний вектору pASG103, але Twin-Strep-tag® приєднується до рекомбінантних протеїнів з N-кінця. Вектор pPSG103 містить промотор бактеріофагу T7 для індукції експресії білків, Twin-Strep-tag® із С-кінцевим приєднанням до рекомбінантного протеїну, а також гени стійкості до ампіциліну. Експресія генів-мішеней індукується шляхом надання джерела T7 РНК-полімерази клітиною-хазяїном. Вектор pPSG105 ідентичний до вектору pPSG103 за винятком N-кінцевого приєднання Twin-Strep-tag® до рекомбінантного протеїну.

Отримані рекомбінантні вектори було клоновано в експресуючий штам *E.coli* Lemo21(DE3), що може бути використаний як для векторів з тет-промотором, так і для векторів з T7-промотором. Індукцію клонів проводили після підрощування в поживному LB-середовищі до показників оптичної щільності (0,6-1,5) за допомогою IPTG (для векторів з T7-промотором) та ангідротетрацикліну (для векторів з тет-промотором), з додаванням карбеніциліну (аналог пеніциліну, що має кращу стабільність). Для перевірки ефективності клонування спочатку проводили швидку очистку супернатанту з протеїнами та пелет колонками Strep-Tactin Superflow (IBA, Німеччина), після чого отримані елюенти перевіряли в горизонтальному електрофорезі з барвником Coomassie (рис.3.1).

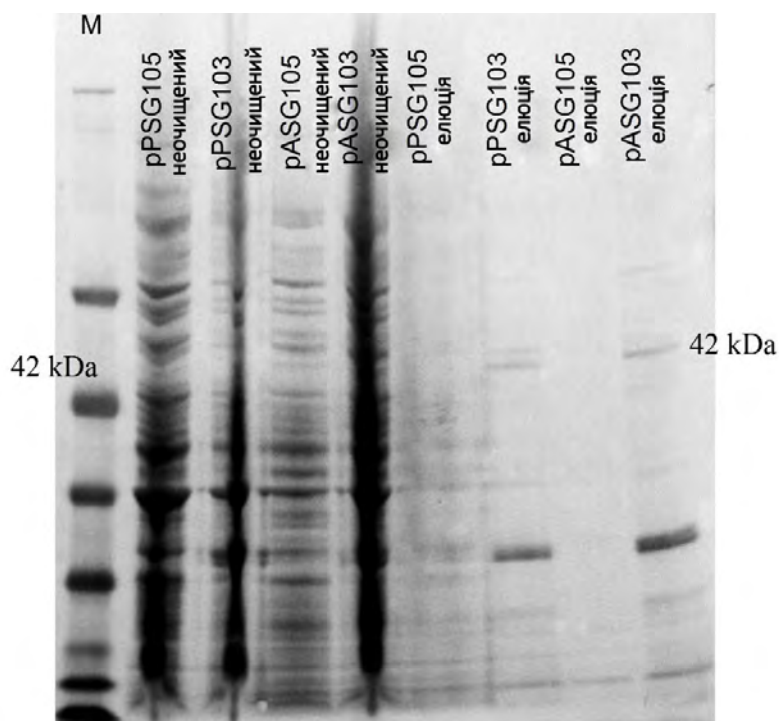


Рисунок 3.1 Візуалізація результатів індукції протеїну FTT0975 за допомогою горизонтального фореузу з барвником Coomassie. М – маркер довжини SeeBlue Plus2 Prestained

Як можна побачити з рис.3.1, протеїн FTT0975 розміром 42 кДа був успішно індукований в клонах, що мали плазміди rASG103 та rPSG103. Інші вектори, що мали N-кінцеве приєднання рекомбінантного протеїну до Twin-Strep-tag®, не були індуковані. Крім цього, клони, що містили рекомбінований вектор rASG103 (з тет-промотором), мали кращі показники росту в культурі, ніж клони з вектором rPSG103 (з T7-промотором): оптична щільність культури після 4 годин інкубування дорівнювала 1,2 проти оптичної щільності 0,6 відповідно.

Виходячи з цих характеристик, для всіх подальших випробувань та проведення клонування з протеїнами SucB та GroEl було обрано вектор rASG103 (рис. 3.2).



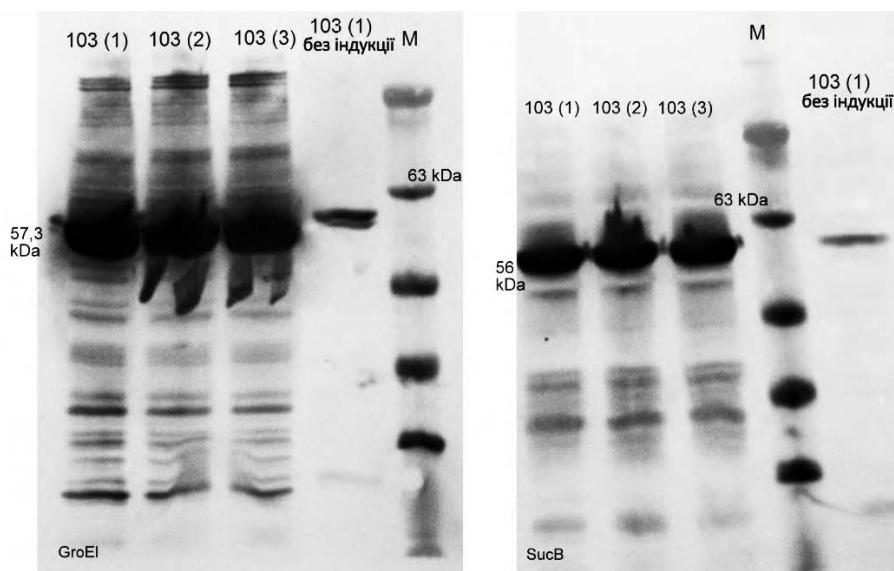


Рисунок 3.2 Результати вестерн-блотингу індукції протеїнів GroEl (зліва) та SucB (зправа) з використанням вектору рASG103 і антитіл, специфічних до Strep-tag. М – маркер довжини SeeBlue Plus2 Prestained; № 1-3 – номери окремих колоній, обраних для індукції

Результати вестерн-блотингу свідчать, що напрацювання протеїнів було успішним, але невелика кількість протеїну продукується клонами навіть без індукції – так звана «протікаюча» експресія білка (leaky expression). Незважаючи на це, створені клони можна використовувати у подальших дослідженнях в якості продуцентів цільових протеїнів.

На наступному етапі було проведене очищення протеїнів із супернатанту з використанням вискоєфективної рідинної хроматографічної системи Akta pure. Для очищення кожного протеїну використовували окрему афінну до Strep-tag колонку Strep-Tactin®ХТ (ІВА, Німеччина). Для перевірки очищення протеїну FTT0975 був проведений вестерн-блотинг, так як при проведенні горизонтального електрофорезу з барвником Coomassie, окрім протеїну FTT0975, також було виявлено фракції нецільової довжини (рис.3.3).

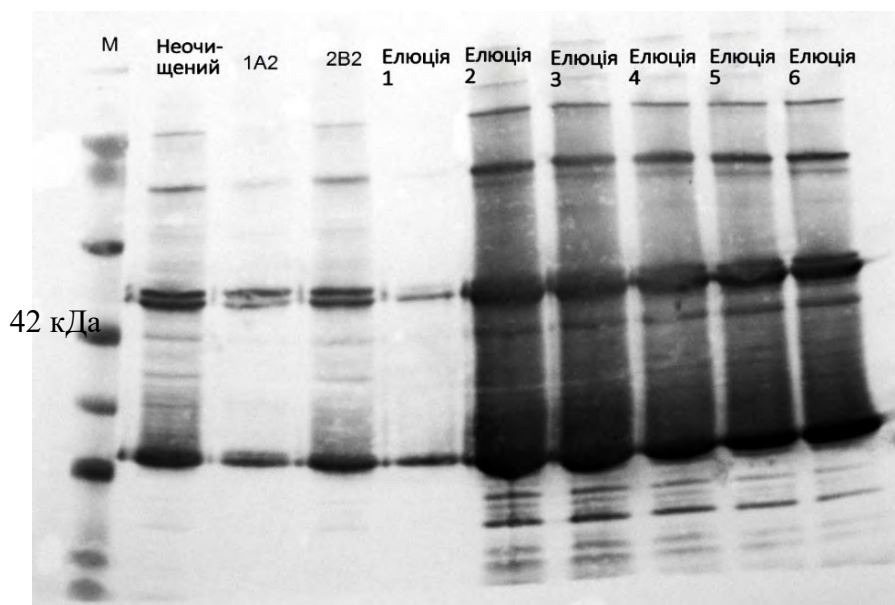


Рисунок 3.3 Результати вестерн-блотингу хроматографічної очистки протеїну FTT0975 з використанням антитіл, специфічних до Strep-tag. М – маркер довжини SeeBlue Plus2 Prestained; not purified – неочищений супернатант з протеїном, 1A2 – виток з колонки під час загрузки зразка на колонку, 2B2 – фракції під час відмивання колонки, Елюція 1-5 – елюйовані фракції протеїну

Ступінь очищення протеїну FTT0975 був на належному рівні, не зважаючи на неспецифічні фракції, що не відповідали потрібній довжині цільового протеїну (42 кДа). Ми припустили, що ці фракції є як димерами, так і денатурованими частинами цільового протеїну, так як вони зв'язуються з вторинними антитілами при проведенні вестерн-блотингу, тому було доцільним продовжувати випробування цього протеїну.

Результати очищення протеїнів SucB та GroEl перевіряли в горизонтальному електрофорезі з барвником Coomassie (рис.3.4).

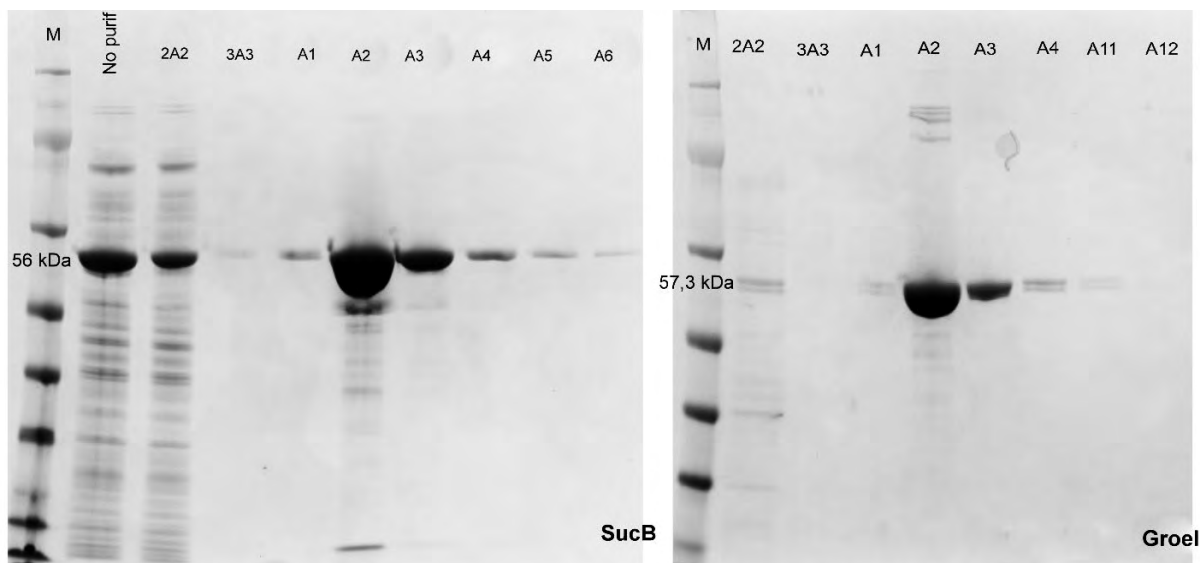


Рисунок 3.4 Результати хроматографічної очистки протеїнів SucB (зліва) та GroEl (зправа) в горизонтальному електрофорезі з барвником Coomassie. М – маркер довжини SeeBlue Plus2 Prestained; not purify. – неочищений супернатант з протеїном, 2A2 – виток з колонки під час завантаження зразка на колонку, 3A3 – фракції під час відмивання колонки, А 1-6, 11,12 – елюйовані фракції протеїнів

Як можна побачити з рис. 3.4, хроматографічна очистка протеїнів SucB та GroEl була вдалою, в елюенті виявлено здебільшого цільові протеїни із слідовими залишками неспецифіки.

Подальше випробування очищених протеїнів FTT0975, Sucb та GroEl проводили методом вестерн-блотингу з позитивними реконвалесцентними сироватками до *F.tularensis* від свиней (імунізовані LVS) та людей і негативними сироватками для визначення антигенних властивостей протеїнів. Були обрані наступні елюйовані фракції: FTT0975 – фракція E4 (273 мкг/мл), SucB – фракція E4 (274 мкг/мл) та GroEl – фракція A3 (208 мкг/мл) (рис.3.5).

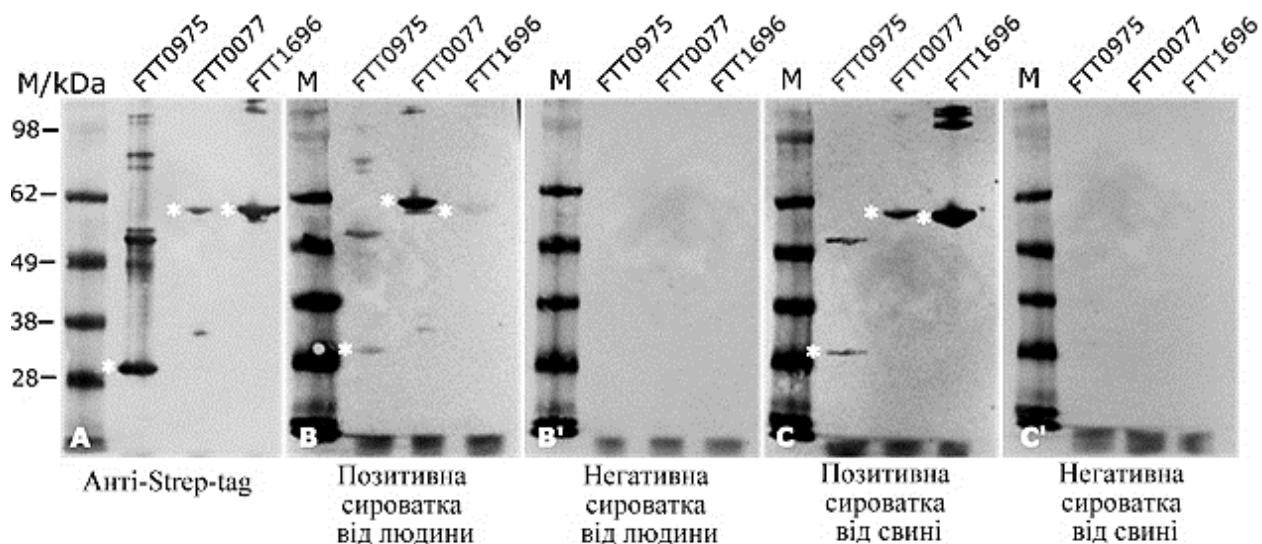


Рисунок 3.5 Результати вестерн-блотингу очищених протеїнів з позитивними і негативними сироватками від людини та свині. М – маркер довжини SeeBlue Plus2 Prestained. Зірочкою позначені протеїни очікуваної ваги (FTT0975: 26 кДа; FTT0077: 52 кДа; FTT1696: 57 кДа)

Досліди показали, що всі три досліджувані протеїни мали антигенні властості (рис. 3.5) та не демонстрували фонового сигналу при дослідженні з негативними сироватками.

Далі, ці протеїни були випробувані як антигени при проведенні непрямого ІФА. Використовували ті ж самі елюйовані фракції, що і при проведенні вестерн-блотингу: FTT0975 – фракція E4 (273 мкг/мл), Sucb – фракція E4 (274 мкг/мл) та GroE1 – фракція A3 (208 мкг/мл). Кожен протеїн був серійно розведений у співвідношенні 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 і 1:800 в карбонатному буфері. Всі дослідження проводили у трьох повторах, значення коефіцієнту варіативності повторюваності (Intra CV) для всіх титрувань було менше 10% та коливалося у рамках 3-6%. Позитивні та негативні зразки сироваток, що використовували при тестуванні, також

титрували у співвідношенні 1:50, 1:100, 1:200, 1:400. Результати першого випробування протеїну FTT0975 вказані у Додатку Д.

Протеїн FTT0975 мав в два рази вищу активність при визначенні антитіл до туляремії у сироватках крові свиней, ніж у клінічних зразках від людей (наприклад, найвище значення оптичної щільності позитивного зразку при мінімальному розведенні антигену та сироваток дорівнювало  $2,424 \pm 0,005$  проти  $1,266 \pm 0,002$ ). При виборі робочої концентрації для подальшого використання протеїну FTT0975 звертали увагу не тільки на силу сигналу позитивних зразків, а і на співвідношення сигналу позитивного зразку та фонового сигналу негативного зразку. Також, при виборі робочих концентрацій спирались на динаміку зменшення сигналу: при різкому нелінійному зменшенні сигналу обирали для роботи найближчі попередні стабільні концентрації. Лінійність титрування визначали за величиною достовірності апроксимації  $R^2$  для лінійного рівняння, що коливалась в рамках 0,921-0,663 при дослідженні сироваток від свиней, та 0,924-0,7462 при дослідженні сироваток від людей. Чим ближче значення  $R^2$  до одиниці, тим достовірніша лінія тренду (Рисунок 3.6). За цими параметрами, для використання протеїну FTT0975 було обрано оптимальне розведення 1:100 (або 2,73 мкг/мл) при розведенні досліджуваних сироваток від свині 1:200 та від людини 1:50.

Результати першого випробування протеїну SucB вказані у Додатку Ж. У порівнянні з протеїном FTT0975, протеїн SucB демонстрував трохи нижчий сигнал при тестуванні сироваток від свиней (максимальний сигнал  $2,006 \pm 0,009$  проти  $2,424 \pm 0,005$  та трохи вищий сигнал при тестуванні сироваток від людей (максимальний сигнал  $1,517 \pm 0,012$  проти  $1,266 \pm 0,002$  (рис. 3.6 А)).

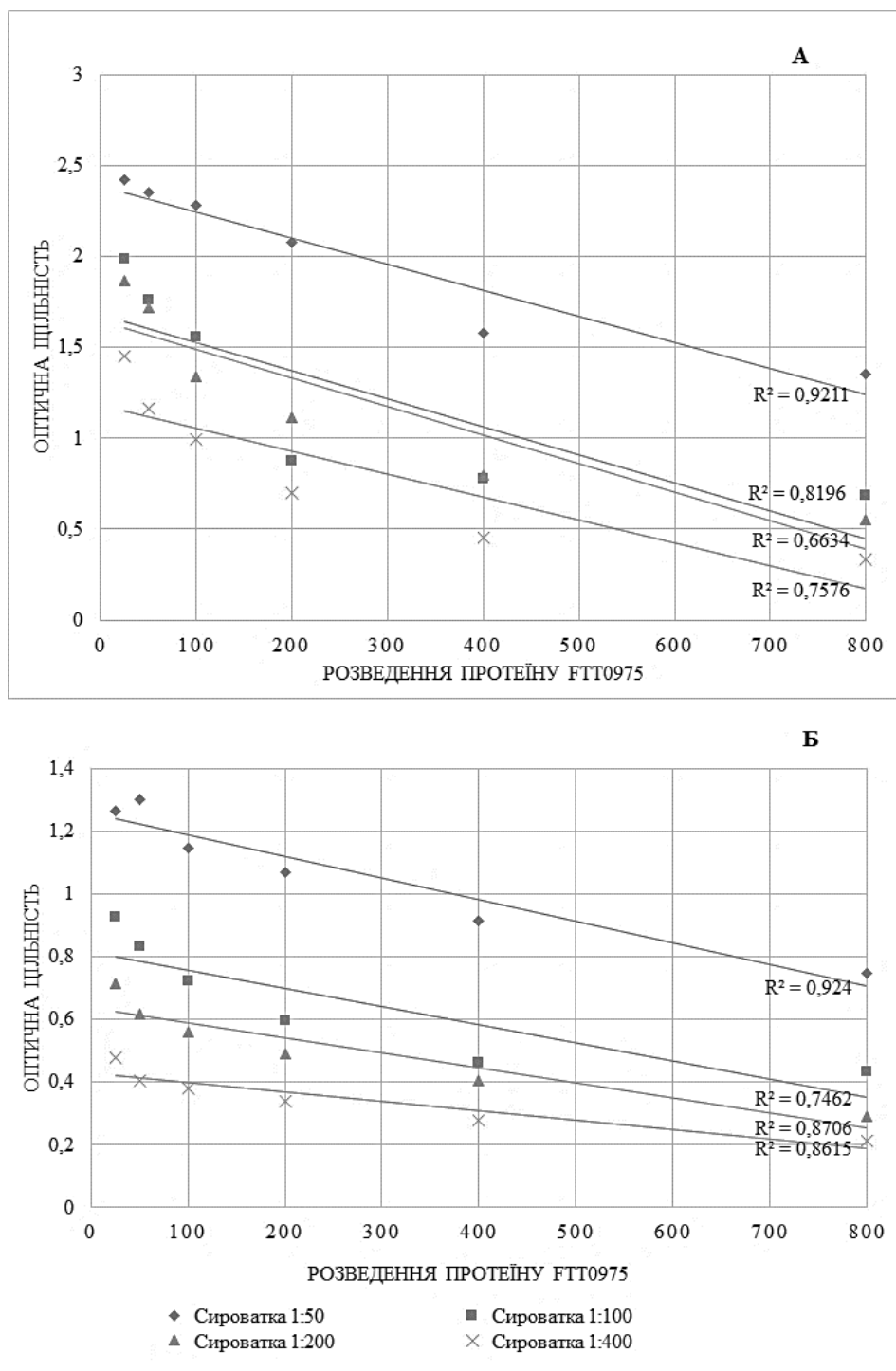


Рисунок 3.6 Титрування протеїну FTT0975 у якості антигену з позитивними і негативними сироватками від свині (А) та людини (Б)

Також, протеїн SucB у динаміці був менш стабільним при дослідженні сироваток від свиней: оптична густина зменшувалася нелінійно при розведенні антигену (значення  $R^2$  для лінійного рівняння знаходилось в проміжку між 0,756 до 0,543) (рис. 3.7 А). Лінійність аналізу при дослідженні сироваток від людей була достовірнішою (коефіцієнт лінійності наближався до одиниці): 0,717-0,982. Протеїн SucB також мав вищі антигенні властивості при визначенні антитіл до туляремії в сироватках від свиней, ніж від людей (найвище значення оптичної густини позитивного зразку при розведенні антигену 1:200 і мінімальному розведенні сироваток дорівнювало  $2,006 \pm 0,009$  проти  $1,517 \pm 0,012$ ) (рис. 3.7).

Робочі концентрації обирали за тими ж критеріями (сила і співвідношення сигналу позитивних і негативних сироваток та лінійність), що і для протеїну FTT0975. Для подальшого випробування протеїну SucB у якості антигену було обрано оптимальне розведення протеїну у співвідношенні 1:200 (або 1,37 мкг/мл) в карбонатному буфері при розведенні досліджуваних сироваток від свині та від людини 1:100.

Результати першого випробування протеїну GroE1 вказані у Додатку 3. Протеїн GroE1 виявився найбільш активним серед трьох досліджуваних антигенів як при тестуванні сироваток від свиней (максимальна оптична густина досягала  $2,535 \pm 0,05$  проти  $2,006 \pm 0,009$  (SucB) та  $2,424 \pm 0,005$  (FTT0975)), так і при тестуванні сироваток крові людей ( $1,784 \pm 0,006$  проти (SucB)  $1,517 \pm 0,012$  та  $1,266 \pm 0,002$  (FTT0975)).

Як і в попередніх випадках, протеїн демонстрував кращий сигнал при тестуванні сироваток від свиней, ніж від людей, причому фоновий сигнал негативних зразків був найвищий (в порівнянні, при мінімальному розведенні сироваток 1:50, розподіл при різних розведеннях для протеїну GroE1 був

$0,662 \pm 0,013 - 0,513 \pm 0,001$ ; для протеїну FTT0975 -  $0,582 \pm 0,06 - 0,41 \pm 0,02$ ; для протеїну SucB -  $0,513 \pm 0,008 - 0,333 \pm 0,012$ ) (Додаток 3).

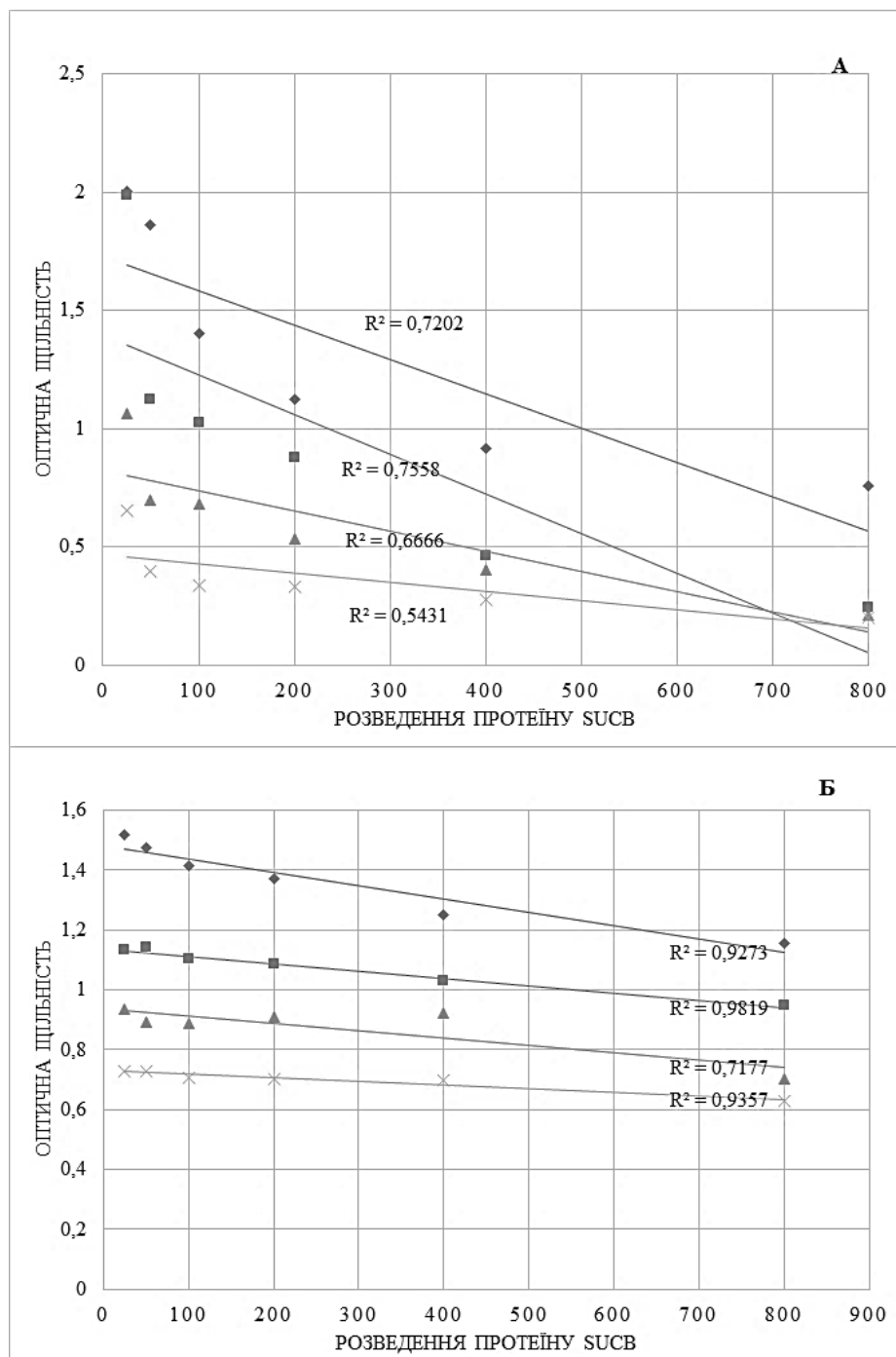


Рисунок 3.7 Випробування протеїну SucB у якості антигену з позитивними і негативними сироватками від свині (А) та людини (Б)



Робочі концентрації обирали за тими ж критеріями (сила і співвідношення сигналу позитивних і негативних сироваток та лінійність), що і для інших досліджуваних протеїнів. Лінійність методу при випробуванні протеїну GroE1 була достовірною і мала кращий результат при випробуванні сироваток від свиней (значення  $R^2$  для лінійного рівняння знаходилось в проміжку між 0,922-0,856) (рис. 3.8). Для подальшого випробування протеїну GroE1 у якості антигену, було обрано оптимальне розведення 1:200 (або 1,04 мкг/мл) у карбонатному буфері при розведенні досліджуваних сироваток від свині 1:200 та від людини 1:100.

Таким чином, нами були виявлені оптимальні концентрації рекомбінантних антигенів та сироваток для проведення досліджень щодо антитіл проти збудника туляремії у сироватках від людей та свиней. Протеїн GroE1 рекомендується використовувати у концентрації 1,04 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:100 від людей. Протеїн FTT0975 рекомендується використовувати у концентрації 2,73 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:50 від людей. Протеїн SucB рекомендується використовувати у концентрації 1,37 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:100 як від свиней, так і від людей.

Наступним етапом дослідження було визначення внутрішньосистемного (Intra CV або повторюваність) і міжсистемного (Inter CV або відтворюваність) коефіцієнтів варіативності імуноферментного аналізу з використанням вищезазначених оптимальних розведень антигенів та сироваток і перевірка можливих перехресних реакцій рекомбінантних антигенів з сироватками від свиней, позитивними щодо антитіл проти *Brucella spp.* Повторюваність і відтворюваність визначають для оцінки ймовірності виникнення помилок під час вимірювання зразку у декількох повторях в одному та різних планшетах.

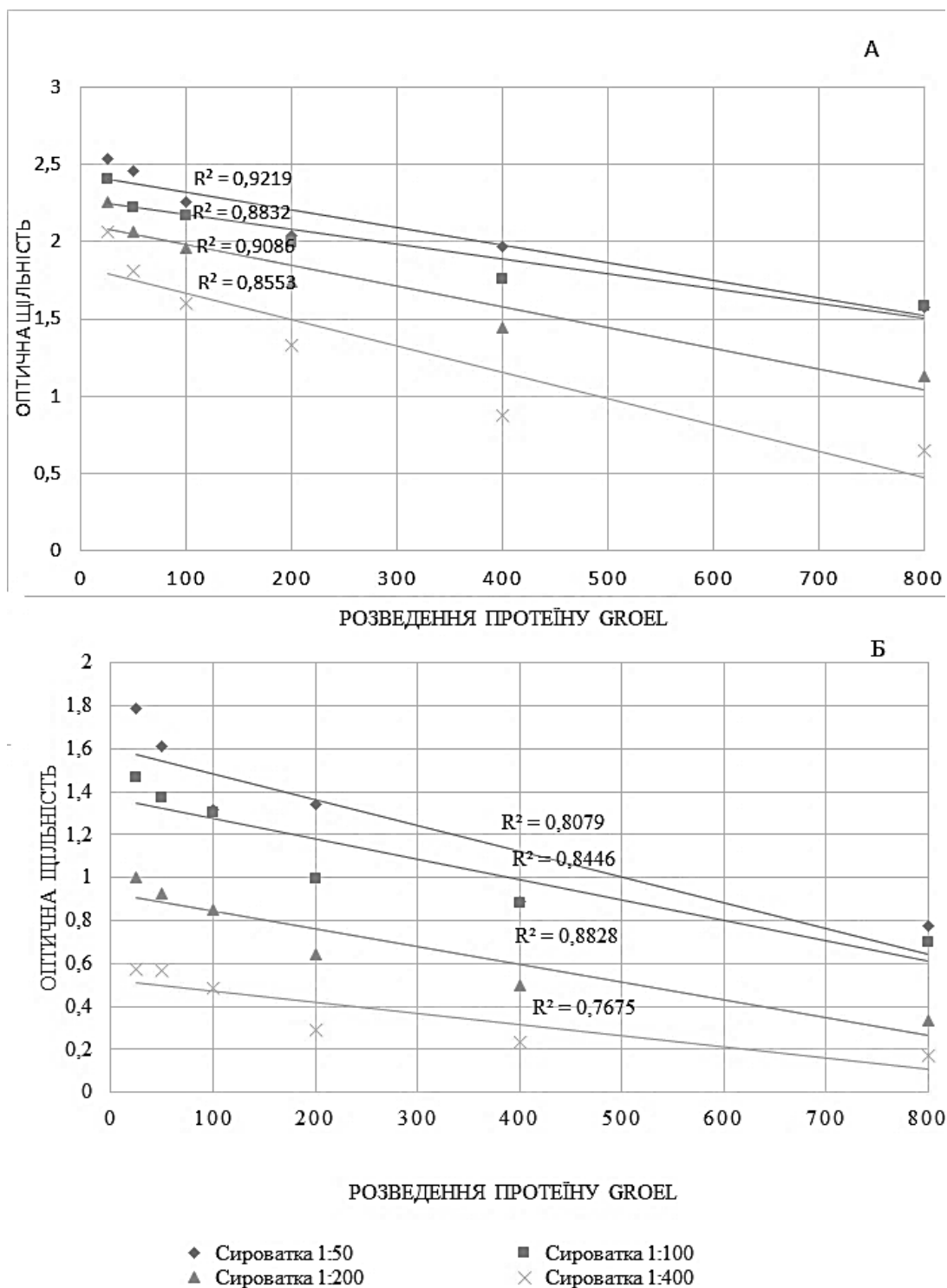


Рисунок 3.8 Випробування протеїну GroE1 у якості антигену з позитивними і негативними сироватками від свині (А) та людини (Б)

Протеїни були випробувані на тест-панелі, до якої були включені сироватки позитивні щодо *F. tularensis* subsp. *holarctica* (позитивний контроль), *F. tularensis* subsp. *philomiragia*, *F. tularensis* subsp. *novicida*, *Brucella spp.* та негативні сироватки. Для визначення повторюваності, зразки досліджували в чотирьох повторах, для відтворюваності – в трьох різних планшетах протягом трьох днів. Значення внутрішньосистемних коефіцієнтів варіативності не перевищували допустимі 10% (у рамках від 0,252% до 3,785%, в середньому 1,801%) (Додаток И). Значення міжсистемних коефіцієнтів варіативності не перевищували допустимі 15% (у рамках від 0,947% до 2,630%, в середньому 1,811%) що підтверджує достовірність отриманих результатів (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1

Значення міжсистемних коефіцієнтів варіативності для рекомбінантних антигенів, випробуваних із панеллю сироваток крові від свиней

Тип сироватки	SucB		FTT0975		GroEl	
	Середнє значення для різних планшетів	Inter CV, %	Середнє значення для різних планшетів	Inter CV, %	Середнє значення для різних планшетів	Inter CV, %
<i>F.tul.</i> subsp. <i>holarctica</i>	1,396±0,01 7	1,250	1,265±0,01 3	1,025	1,947±0,03 3	1,684
<i>F.tul.</i> subsp. <i>philomiragia</i>	1,253±0,02	1,590	0,444±0,00 9	2,083	1,371±0,03 6	2,630
<i>F.tul.</i> subsp. <i>novicida</i>	1,181±0,02 5	2,144	0,689±0,01 6	2,256	0,693±0,01 6	2,372
<i>Brucella spp.</i>	0,486±0,00 6	1,184	0,746±0,01 6	2,092	0,621±0,00 6	0,947
Негативна сироватка	0,303±0,00 8	2,592	0,420±0,00 7	1,621	0,4±0,007	1,696

При схожих результатах фону і негативних контролів, найбільш сильний сигнал з позитивними сироватками *F. tularensis* subsp. *holarctica* був виявлений у протеїна GroEl ( $1,947 \pm 0,033$ ). Значно нижчим був сигнал протеїну SucB ( $1,396 \pm 0,017$ ), і найнижчий сигнал виявився у протеїну FTT0975 ( $1,265 \pm 0,013$ ).

При дослідженні перехресних реакцій рекомбінантних антигенів з сироватками, позитивними проти підтипів *F. tularensis* було виявлено, що всі три протеїни демонструють крос-реактивність з усіма дослідженими підтипами збудника туляремії (рис. 3.9).

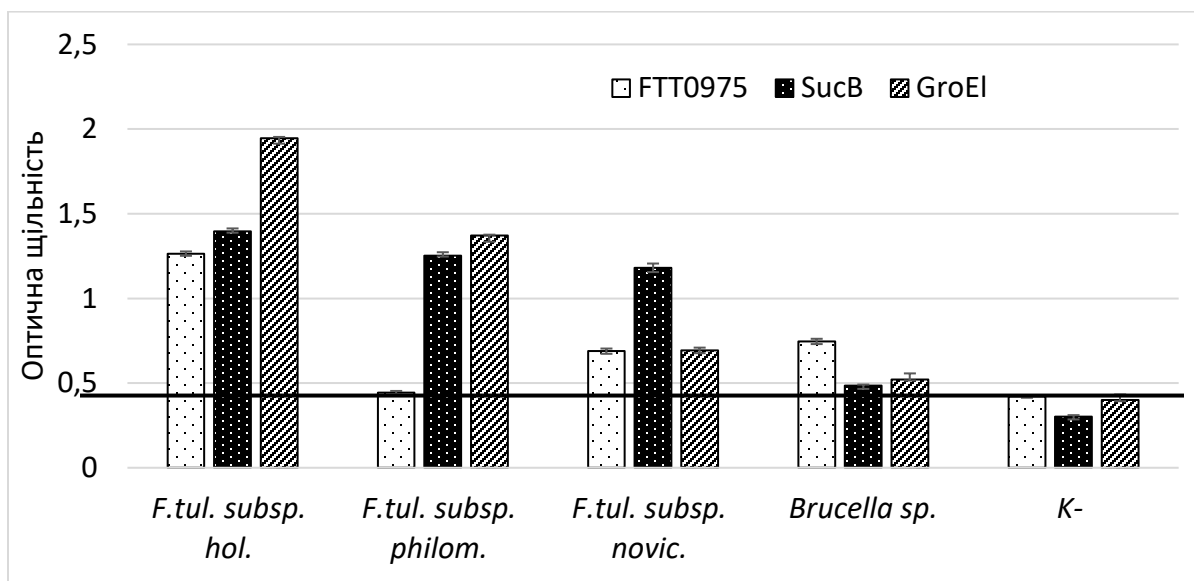


Рисунок 3.9 Випробування протеїнів FTT 0975, GroEl, SucB з панеллю сироваток від свиней. Чорною лінією позначено середнє порогове значення для негативних результатів (0,353)

Для всіх трьох зразків було відмічено перехресні реакції з антитілами до *Brucella spp.*, але співвідношення значень оптичної густини при дослідженні сироваток крові свиней, позитивних до *Brucella spp.* та *F. tularensis* subsp. *holarctica*, було найвищим для протеїну GroEl (рис. 3.10).

При оптимізації ІФА одним із найважливіших критеріїв є різниця між значеннями оптичної щільності негативного та позитивного контролів, яка повинна бути якомога більше. У нашому випадку, крім співвідношення значень оптичної щільності позитивних та негативних контролів, також перевіряли співвідношення значень між позитивним контролем та зразками, позитивними щодо збудника бруцельозу для виявлення найменш крос-реактивного протеїну (рис. 3.10).

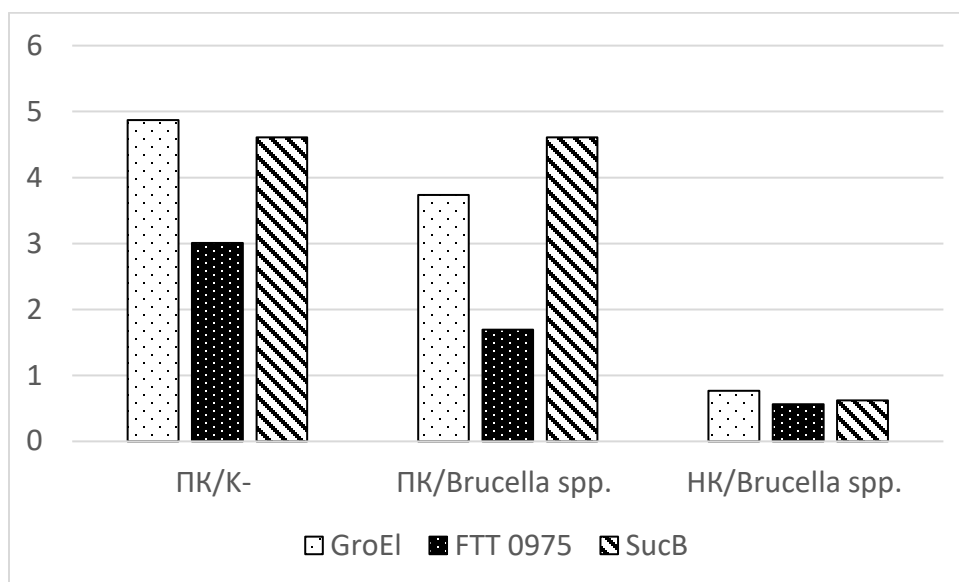


Рисунок 3.10 Співвідношення середніх значень оптичної щільності позитивного (ПК) і негативного (К-) контролів *F.tularensis* та позитивного (ПК) і негативного (НК) контролів і сироватки, позитивної до *Brucella sp* при випробуванні різних антигенів.

Як видно з рисунку 3.10, крос-реактивність з сироватками, позитивними щодо бруцел була найвища для протеїну FTT0975. Крім цього, співвідношення позитивного контролю і негативного контролю для протеїну FTT0975 було найнижчим (співвідношення сигналів позитивного і негативного контролю дорівнювало 3, в той час як для протеїнів GroEl і SucB

співвідношення дорівнювало 4,9 і 4,6, відповідно). Тому, було вирішено не продовжувати випробовування для даного протеїну та рекомендувати його лише для диференціації підтипів *F.tularensis*, а саме subsp. *philomiragia* і *novicida*. Найбільша різниця між співвідношеннями позитивного контролю і негативного контролю простежувалась для протеїну GroEl. Але цей протеїн має високу крос-реактивність з іншими підтипами *F. tularensis*: subsp. *philomiragia* та *novicida*. Даний білок найкраще підходить для дослідження сироваток від диких кабанів з метою виявлення загальнородових антитіл проти збудника туляремії. Протеїн SucB мав найнижчу крос-реактивність із сироватками, позитивними проти бруцел, але він також мав високу крос-реактивність з іншими підтипами *F. tularensis*.

Таким чином, для подальшого випробування у якості антигенів для ІФА нами були обрані протеїни GroEl та SucB. Ці протеїни перевіряли в трьох повторях на панелі сироваток від диких кабанів (n=100) та порівнювали результати з ІФА, розробленим Інститутом мікробіології Бундесверу, що засновується на використанні ліпополісахаридного антигену. Достовірність результатів підтверджували методом вестерн-блотингу. Зразки, що були позитивні в ІФА, але непідтвердженні у вестерн-блотингу перевіряли щодо антитіл проти бруцел комерційним набором (Serion ELISA classic Brucella IgG kit, Institut Virion/Serion, Німеччина) (таблиця 3.2).

Як можна побачити з таблиці 3.2, чутливість всіх трьох методик дорівнювала 100% при підтвердженні результатів методом вестерн-блотингу, а саме – хибно негативних результатів не було виявлено. Обидві розроблені в роботі методики (зановані на антигенах GroEl і SucB) є більш специфічними в порівнянні з ІФА, розробленим Інститутом мікробіології

Бундесверу. Найвищу специфічність продемонстрував ІФА з використанням антигену SucB (75,5 %).

Таблиця 3.2

Порівняння чутливості і специфічності способів імуноферментної детекції антитіл проти *F.tularensis* власного виробництва і виробництва ІМБ (Німеччина)

Способи детекції антитіл проти <i>F.tularensis</i> , що порівнюються	Чутливість, %	Специфічність, %	Крос-реактивність з <i>Brucella spp.</i> , %
ІФА, заснований на ЛПС (ІМБ, Німеччина)	100	71	12
ІФА, заснований на протеїні SucB	100	75,5	6,5
ІФА, заснований на протеїні GroEl	100	75	8

Для перевірки крос-реактивності, всі хибно-позитивні зразки були протестовані щодо наявності антитіл проти *Brucella spp.*. Розроблені в роботі системи, засновані на протеїнах SucB і GroEl мали нижчу крос-реактивність до антитіл проти *Brucella spp* в порівнянні з ІФА Інституту мікробіології Бундесверу: (6,5% та 8% проти 12%, відповідно).

Таким чином, нами було розроблено і отримано рекомбінантні антигени GroEl, SucB і FTT0975 *F. tularensis* і підтверджено їх антигенні властивості при дослідженні сироваток від людей і свиней. Було підтверджено ефективність використання протеїнів GroEl і SucB в ІФА щодо антитіл проти збудника туляремії у сироватках від свиней (чутливість обох методів становила 100%, специфічність 75,5% для ІФА, заснованого на протеїні SucB і 75% для ІФА, заснованого на протеїні GroEl), а також

визначено оптимальні концентрації антигенів і сироваток для проведення досліджень. Протеїн GroE1 у концентрації 1,04 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:100 від людей рекомендується для використання як антиген при проведенні непрямого ІФА для загальнородової диференціації антитіл до *F. tularensis*. Протеїн SucB також може використовуватись для загальнородової диференціації антитіл до збудників туляремії у концентрації 1,37 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:100 як від свиней, так і від людей. Протеїн FTT0975 у концентрації 2,73 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:50 від людей рекомендується для використання як антиген при проведенні непрямого ІФА для диференціації підтипів *F. tularensis*.

Створена методика захищена патентом України на корисну модель № UA 143739 «Спосіб отримання рекомбінантних антигенів GroE1FTT, FTT0975, SucBFTT для діагностики туляремії за допомогою ІФА» (Додаток А)

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях*

1) Development of recombinant antigen-based ELISA for the detection of anti-tularemia antibodies in swine and human sera: a pilot study / Zlenko O. B., Popp C., von Buttlar H., Gerilovych A. P., Schwarz J. *Biotechnologia Acta*. 2020. Vol. 13, No 1. P. 45-55 [125].

### **3.2. Розробка рекомбінантного позитивного контролю для виявлення генетичного матеріалу збудника туляремії**

При дослідженні клінічних зразків та зразків середовища щодо вмісту генетичного матеріалу *F.tularensis* бажано застосовувати методи, в яких в



якості позитивного контролю не використовується жива культура збудника туляремії, адже це становить небезпеку для лабораторного персоналу. Тому, з метою отримання рекомбінантного позитивного контрольного зразку для діагностики збудника туляремії методом ПЛР, було сконструйовано плазмідний вектор рTZ57R/T, який містить вставку ділянки гена *tul4* (103 п.н.), що є консервативним для всіх підтипів *F.tularensis*. Вектор було трансформовано до компетентних клітин *E.coli* DH5a. Повна довжина створеного вектору складала 2990 п.н. (рис. 3.11)

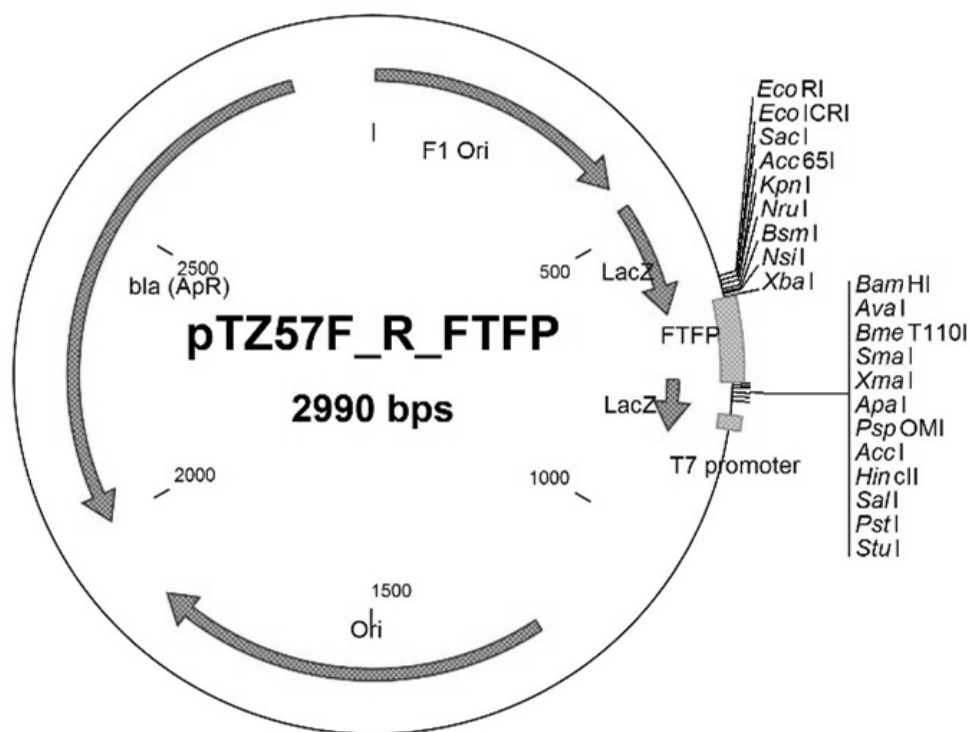


Рисунок 3.11. Рекомбінантний позитивний контрольний зразок рTZ57F\_R\_FTFP для детекції генетичного матеріалу збудника туляремії методом ПЛР

Вектор рTZ57R/T містить ген стійкості до ампіциліну та ген *lacZ*, що використовувались як селективні маркери для перевірки клонів *E. coli* DH5a.

Після проведення синьо-білої трансформації з використанням IPTG та X-Gal у поживному середовищі для перевірки клонів методом ПЛР було обрано 10 білих поодиноких колоній *E. coli*. Спочатку перевірку проводили з використанням специфічних праймерів FT-FP до гена *tul4* (рис. 3.12).

Як видно з рис. 3.12, при проведенні ПЛР з праймерними системами FT-FP найбільш чіткі амплікони цільової довжини без напрацювання неспецифічних ділянок були отримані для клонів під номерами 1, 2 та 3.

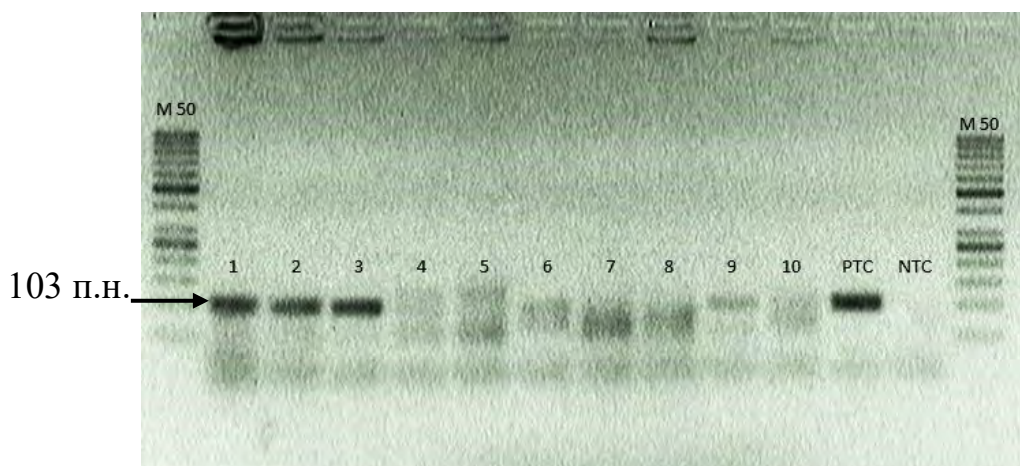


Рисунок 3.12 Електрофореграма скринінгу позитивних колоній до гена *tul4* з використанням праймерних систем FT-FP. М50 – маркер молекулярної ваги (50-1000 п.н.), 1 – 10 – досліджені клони *E.coli* DH5а, РТС – позитивний контроль, NTC – негативний контроль

Таким чином, зазначені клони були обрані для подальших досліджень. Для додаткової перевірки вставки амплікону ділянки гена *tul4* в плазміді було обрано системи праймерів M13 F/R, специфічні до ділянок вектору навколо полілінкерного сайту плазміді (рис. 3.13).

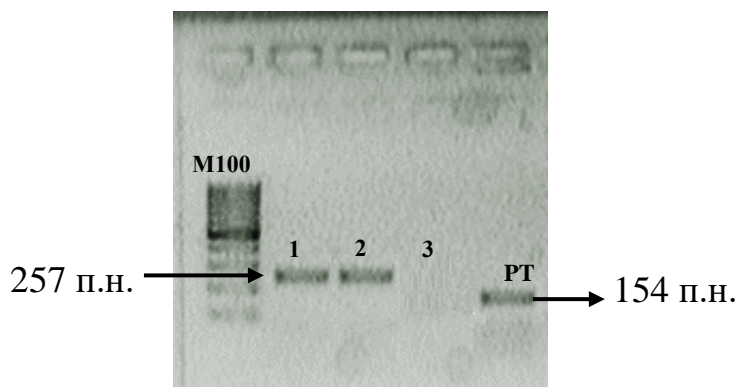


Рисунок 3.13 Електрофореграма результатів скринінгу *tul4*-позитивних колоній з використанням праймерних систем М-13. М100 – маркер молекулярної ваги (100-1000 п.н.), 1 – 3 – досліджені клони *E.coli* Dh5 $\alpha$ , РТ – позитивний контроль (лігована плазміда без вставки)

Було виявлено, що із трьох колоній, тільки колонії №1 та №2 містять вектор рTZ57F/R із вставкою гену *tul4*. Але, за результатами секвенування цих плазмід, лише вставка плазміди колонії №1 відповідала нуклеотидним послідовностям гену *tul4* та була лігійована в правильному напрямку. Вставка плазміди колонії №2 також відповідала нуклеотидним послідовностям гена *tul4*, але була лігійована у зворотньому напрямку. Незважаючи на те, що напрям лігювання вставки у плазміді не впливає на подальші результати векторного плазмідного контролю при проведенні ПЛР, для подальших досліджень були обрані клони колонії №1.

Таким чином, екстраговані плазміди з колонії №1 були обрані для подальших досліджень стосовно визначення чутливості ПЛР із використанням праймерних систем FT-FP (рис 3.14).

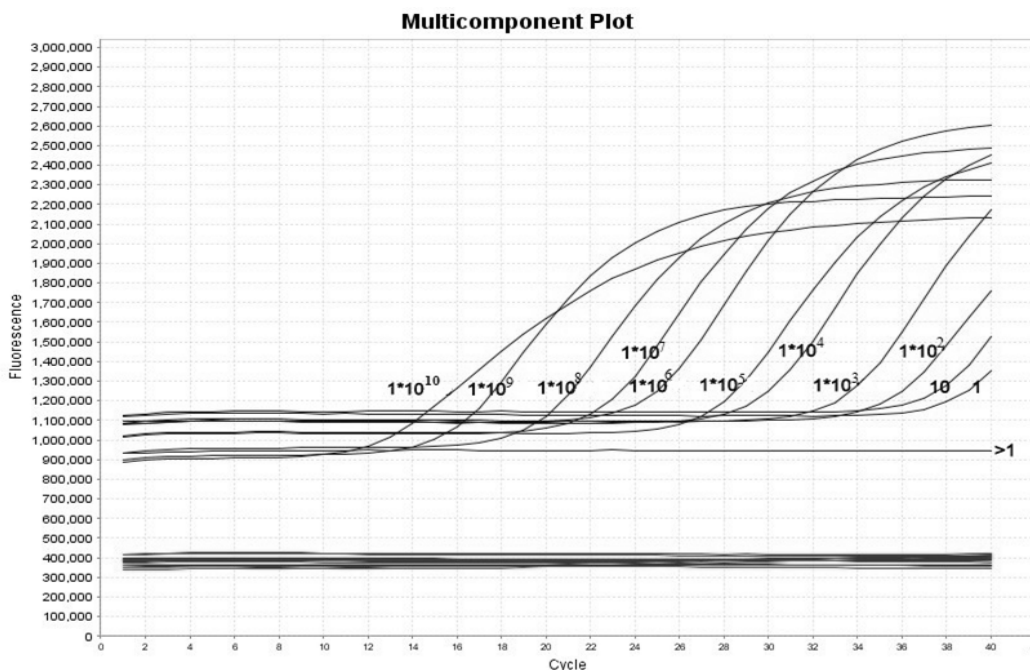


Рисунок 3.14 Ампліфикаційні криві титрування плазміди rTZ57F\_R\_FTFR. На рисунку вказані кількості копій плазмід для кожної реакції в одному мкл.

Реакція з використанням найменших розведень демонструє нижчий сигнал флюоресценції, ніж з використанням більших розведень (наприклад, розведення плазміди до  $10^{10}$  демонструє нижчий сигнал флюоресценції, ніж розведення до  $10^9$ ). Це може бути пов'язано із вкрай великою кількістю напрацьованих ампліконів і неспроможністю приладу правильно провести облік сигналу флюоресценції. При цьому, значення порогового циклу  $C_t$  при титруванні пропорційно зменшуються, що свідчить про зменшення кількості отриманих ампліконів. Поріг чутливості методу становив одну копію у мікролітрі, чи 5 копій на реакцію.

У якості додаткової перевірки, амплікони були досліджені в горизонтальному електрофорезі з агарозним гелем (рис. 3.15).

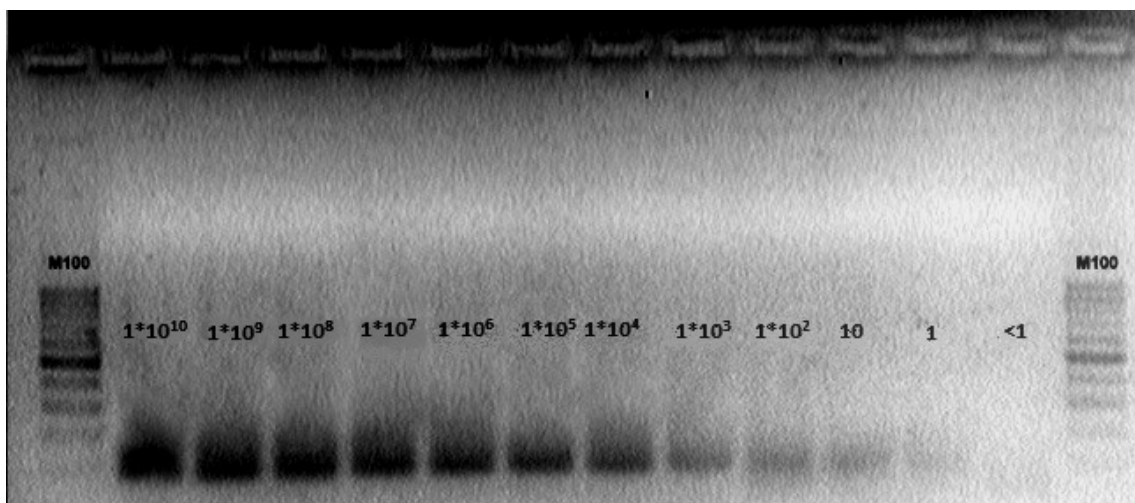


Рисунок 3.15 Електрофореграма результатів титрування плазміди рTZ57F\_R\_FTFR. M100 – маркер молекулярної ваги (100-1000 п.н.)

Електрофореграма титрування плазміди підтверджує результати, отримані при проведенні ПЛР у режимі реального часу. При проведенні візуальної оцінки електрофореграми можна помітити поступове зменшення кількості ампліконів в реакції зі зменшенням титру плазміди.

Отже, було отримано ампіцилін-резистентний клон *E. coli* DH5 $\alpha$ , трансформований сконструйованою плазмідною рTZ57F\_R\_FTFR зі вставкою гену *tul4* довжиною 103 п.н., який може бути використаний у якості позитивного контролю для детекції генетичного матеріалу збудника туляремії як методом класичної ПЛР, так і у режимі реального часу. Поріг чутливості даного методу – одна копія у мікролітрі, чи 5 копій на реакцію.

Таким чином, були створені методики конструювання плазмідного позитивного контролю для детекції генетичного матеріалу збудника туляремії і проведення ПЛР, які захищені патентами України на корисну модель № UA 135803 «Рекомбінантний контрольний зразок для виявлення ДНК збудника туляремії методом полімеразної ланцюгової реакції рTZ57R/T\_FTFR» і №UA 133254 «Тест-система для виявлення ДНК збудника

туляремії за допомогою полімеразної ланцюгової реакції "Tul-DNA-test"» (додаток Б, додаток В).

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях*

1. Zlenko O.B., Gerilovych A.P. Development of recombinant positive control for *Francisella tularensis* detection by qPCR / *Biotechnologia Acta*. 2018. Vol. 11, No 4. P. 68-72 [126].

### **3.3. Проведення скринінгових досліджень щодо місцезнаходження можливих природних осередків туляремії**

#### **3.3.1. Дослідження сироваток крові від диких кабанів щодо наявності антитіл до *F.tularensis* та *Brucella sp.***

Дикий кабан (*Sus scrofa*) є корінним видом парнокопитих в Україні, що мешкає здебільшого в лісах та лісо-степових зонах. Проблема серопревалентності туляремії серед диких кабанів у світі вивчена недостатньо, а в Україні такі дослідження ніколи не проводили.

Тому, з метою вивчення епізоотологічної ситуації щодо циркуляції туляремії серед диких кабанів України, були проведені серологічні дослідження сироваток від кабанів з різних регіонів.

Для індикації антитіл до туляремії в сироватках крові диких кабанів використовували *in house* методику конкурентного імуноферментного аналізу (кІФА). Дослідження проводили в трьох повторах. Позитивні зразки підтверджували методикою Вестерн-блотингу. Сумнівні зразки (для яких середнє значення оптичної щільності було нижчим за порогове) вважали негативними. Зразки, що одночасно були кІФА-позитивні та Вестерн-блот негативні, перевіряли на вміст антитіл проти бруцельозу комерційним ІФА-

набором (Serion ELISA classic Brucella IgG kit, Institut Virion/Serion, Німеччина).

Було досліджено 701 зразок сироваток від диких кабанів, зібраних протягом 2011-2013 років (таблиця 3.1).

Таблиця 3.3

Кількість досліджених зразків щодо наявності антитіл до *F.tularensis* та *Brucella sp.* методами ІФА та Вестерн-блотингу

Загальна кількість зразків	Позитивні сироватки до <i>F.tularensis</i> в ІФА		Позитивні сироватки до <i>F.tularensis</i> у вестерн-блотингу		Позитивні сироватки до <i>Brucella sp.</i> в ІФА	
	кількість	%	кількість	%	кількість	%
701	270	38,5	86	12,3	141	20,1

У порівнянні з результатами досліджень, проведених в інших країнах Європи, загальний відсоток зразків, серопозитивних до *F.tularensis* (12,3%), є достатньо високим і може свідчити про неблагополучну епізоотологічну та епідеміологічну ситуацію з туляремії в Україні. Зразки були зібрані, в основному, в лісистих та лісостепових регіонах країни, оскільки це найбільш типовий біотоп проживання кабанів. Найвищий відсоток позитивних зразків було виявлено у Чернівецькій та Хмельницькій областях (50% та 41,2% відповідно) (рис. 3.16).

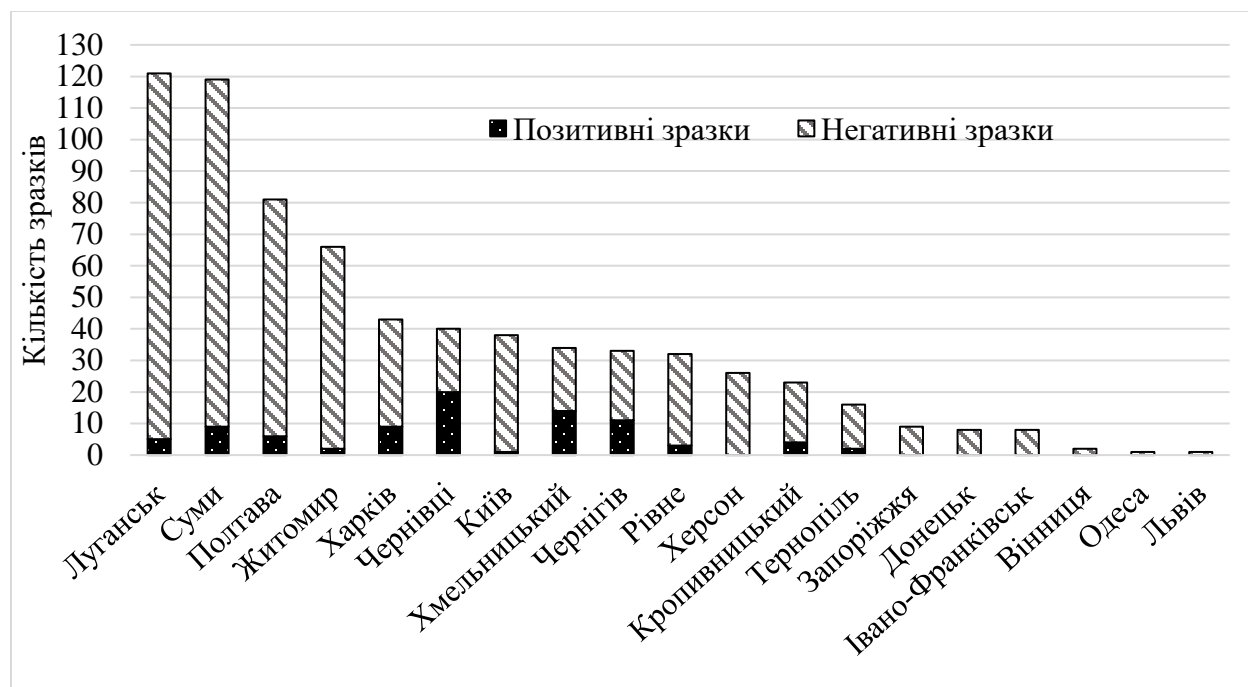


Рисунок 3.16 Відношення серопозитивних та серонегативних зразків до *F.tularensis* по регіонах (підтверджених за результатами вестерн-блотингу)

Ці області розташовані в лісистих регіонах з великою кількістю річок та періодичними повеннями, які можуть сприяти розповсюдженню *F.tularensis* subsp. *holarctica* та її інфікуванням, для якої характерний водний тип поширення. Також, досить високий відсоток позитивних зразків було виявлено у Чернігівській (33,3%) і Харківській областях (21%) (рис. 3.17).

Результати даного дослідження також збігаються з результатами досліджень Центру громадського здоров'я МОЗ України [14] згідно яким найбільш великі та стабільні природні осередки з туляремії розташовані у Чернігівській, Сумській та Хмельницькій областях. Однак деякі лісостепові райони, такі як Харківська область, також відомі як території з постійною циркуляцією збудника туляремії.





Рисунок 3.17 Розташування точок відбору зразків сироваток, що містили антитіла до *F.tularensis*.

Бруцельоз у кабанів широко поширений по всій Центральній Європі [42], [95], [96], і Україна також не є винятком. Офіційно Україна вільна від бруцельозу домашньої худоби, проте, контакт худоби із кабанам чи іншими дикими тваринами та неперевіреними водоймами через вільне випасання тварин несе в собі дуже високий ризик передачі інфекції [97]. На бруцельоз було досліджено 184 зразки, що не були підтверджені у вестерн-блотингу щодо наявності антитіл проти збудника туляремії, із яких 141 зразок (20,1% від загальної кількості зразків) був позитивним (рис.3.18).



Рисунок 3.18 Розташування точок відбору зразків сироваток, що містили антитіла до *Brucella spp.*

Найвищий відсоток позитивних зразків виявлено у Луганській області (76 зразків із 94 досліджених; 80,9%). У сусідній Донецькій області лише один зразок був позитивним. Однак загальна кількість вибірки у Донецьку включає лише 8 зразків, що може призводити до упередженого результату. У Рівненській та Кропивницькій областях було виявлено 19 позитивних зразків із 22 та 12 із 17, відповідно, що є високими показниками (рис.3.19).

Дослідження серомоніторингу диких кабанів щодо туляремійної інфекції було проведено вперше на території України. Було встановлено ймовірні природні осередки туляремійної інфекції в багатьох регіонах країни, особливо в Хмельницькій, Чернігівській, Чернівецькій, Сумській та Харківській областях – лісних та лісостепових регіонах з великою кількістю річок чи періодичними повеннями. Дослідження серомоніторингу диких

кабанів щодо бруцельозної інфекції вказує на ймовірність передачі бруцельозу на територію України через кордон з Російською Федерацією.

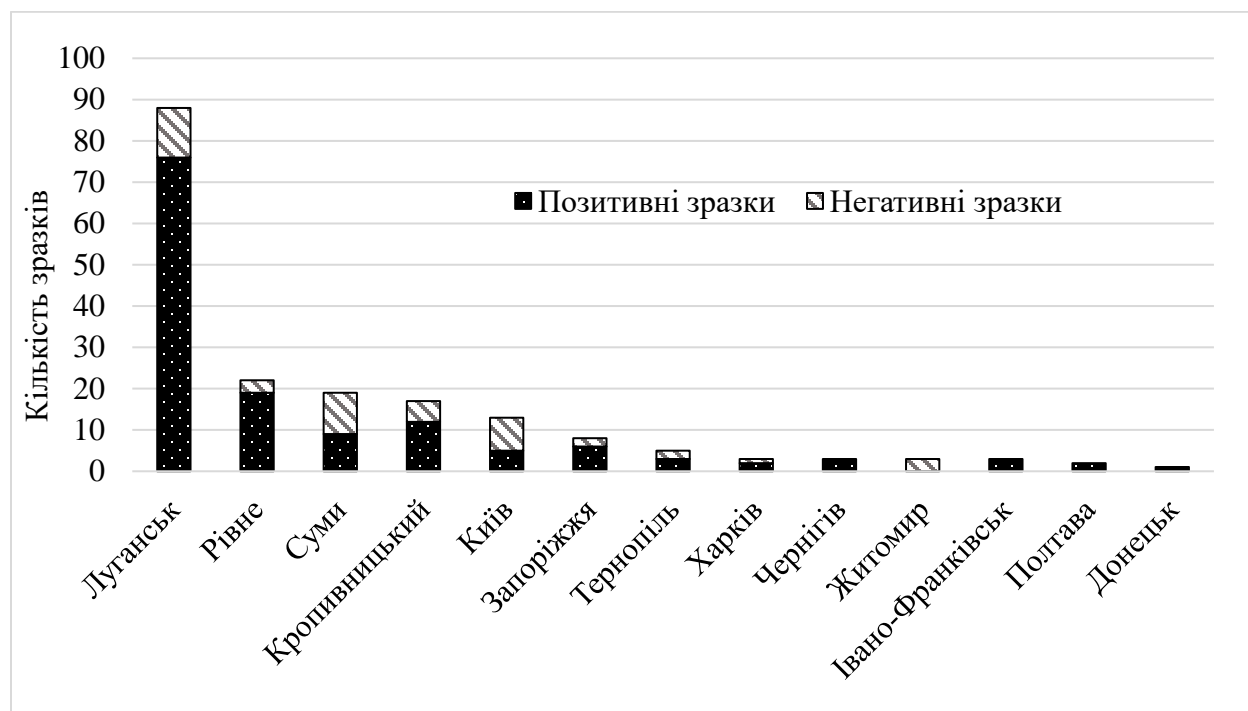


Рисунок 3.19 Співвідношення позитивних та негативних зразків для антитіл проти *Brucella spp.* по областях.

### 3.3.2. Дослідження зразків від гризунів, кліщів та об'єктів довкілля щодо наявності генетичного матеріалу *F.tularensis* у Харківській, Миколаївській та Дніпропетровській областях

Природні осередки туляремії присутні у 23 з 25 областей та охоплюють основні ландшафти та географічні зони України [57, 58, 98]. Харківська область розташована в лісостепових та степових регіонах, Дніпропетровська та Миколаївська області є справжніми степовими районами, і їхні біотопи, сприятливі для проживання гризунів-переносників збудника туляремії, і є частково схожими: нагірні листяні ліси і борові тераси характерні для лісової частини Харківщини; заплавні луки, поля, лісосмуги, ярові ліси характерні для

всіх трьох областей. Окрім гризунів, у досліджуваних регіонах відомо 6 видів іксодових кліщів, що мають важливе значення у передачі та циркуляції туляремії [99-102].

Так як точні причини спалахів туляремії часто залишаються незрозумілими не тільки в Україні, а й по всьому світу, постійний моніторинг стану відомих та потенційних осередків має важливе значення для забезпечення швидкого реагування на інциденти та управління спалахами. Таким чином, метою нашої роботи було обстеження польових зразків (від гризунів, кліщі, пелети, вода та сіно) за допомогою ПЛР для поглибленого вивчення епізоотіологічної ситуації туляремії на територіях Харківської, Дніпропетровської та Миколаївської областей. Дослідження хвостів гризунів замість стандартного дослідження внутрішніх органів було обрано у ряді випадків з причин біобезпеки: розтин тварин, потенційно хворих на туляремію, може проводитися тільки в умовах BSL-3 лабораторії.

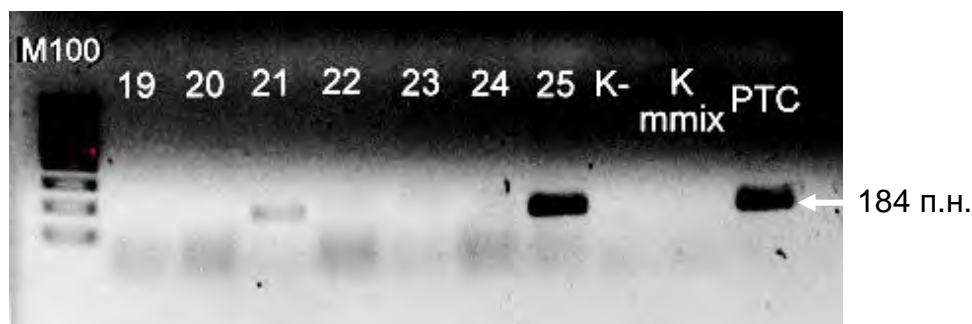


Рисунок 3.20 Результат електрофорезу генетичного матеріалу *F. tularensis* за допомогою системи праймерів Fran16S. М 100 - маркер молекулярної маси; 19-24 – генетичний матеріал із хвостів гризунів (№ 21 - позитивний); 25 - генетичний матеріал із *D. reticulatus* (позитивний); К- - негативний контроль; Кmmix - негативний контроль мастерміксу, РТС - позитивний контроль

Для детекції генетичного матеріалу збудника туляремії проводили ПЛР у реальному часі з використанням праймерних систем FT-FP (Buzard, 2012) та Fran16S власної розробки з подальшим підтвердженням результатів в агарозному гелі (рис. 3.20).

Збіжність результатів, отриманих у реальному часі, та після проведення електрофорезу для обох праймерних систем дорівнювала 100%.

### *Харківська область*

У Харківській області відомо щонайменше 6 осередків туляремії: у Зміївському, Балаклійському, Ізюмському, Великобурлуцькому, Сахновському та Харківському районах. Останній випадок зараження туляремією людини в цій області було зафіксовано у 2003 році. Серед гризунів основними переносниками інфекції вважають *Mus musculus* та *Microtus arvalis* (Офіційні дані Харківського обласного лабораторного центру).

У Харківській області було зібрано 380 зразків (183 хвосту гризунів, 181 кліщ, 15 пелет, 1 проба води), із яких 23% були позитивними щодо вмісту генетичного матеріалу *F. tularensis* (88 зразків): 19,2% (74 зразки) кліщів, 2,6% (10 зразків) хвостів гризунів, 1% (4 зразки) пелет сови сірої (*Strix aluco*). Зразки були зібрані у м. Харків (53 проби), Валківському (52 проби), Харківському (16 проб), Балаклійському (45 проб), Дергачівському (55 проби), Зміївському (61 пробу), Краснокутському (41 проба), Печенізькому (4 проби) і Богодухівському районах (53 проби).

Позитивні результати були виявлені в селі Газове Богодухівського району (48 позитивних зразків); селі Рай-Оленівка Харківського району (10 позитивних зразків); с. Крейдянка Балаклійського району (10 позитивних зразків); НПП «Гомільшанські ліси» Зміївського району (15 позитивних

зразків), харківському лісопарку (4 позитивних зразка) та селі Перекіп Валківського району (1 зразок) (рис. 3.21).

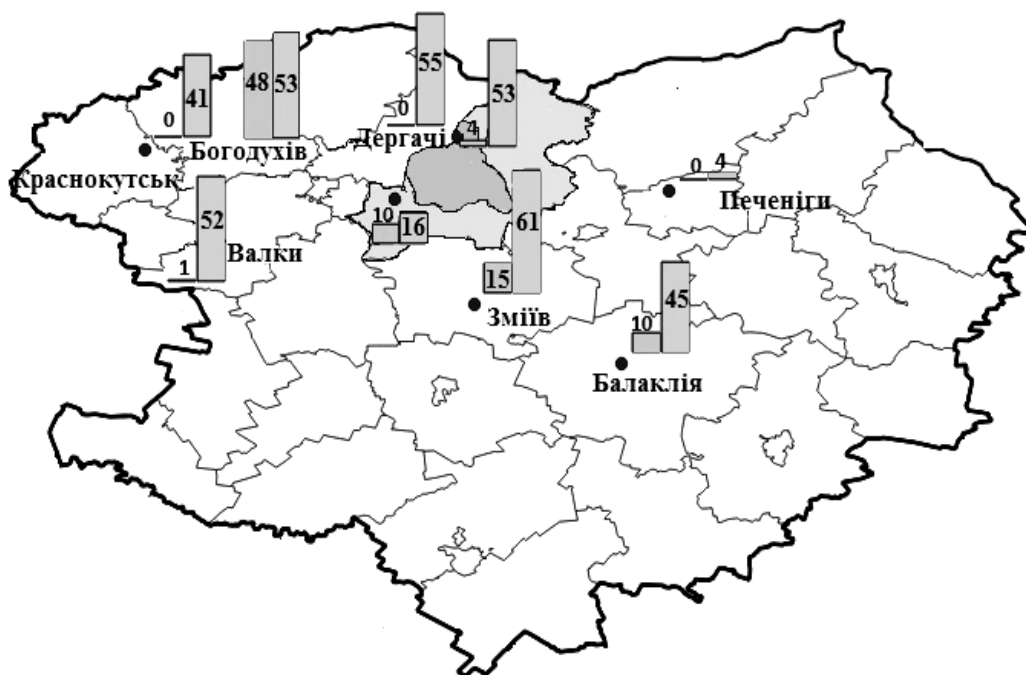


Рис.3.21 Географічне розташування районів відбору проб у Харківській області (зразки групуються за районами). Харків та Харківський район позначені сірим кольором. Позитивні зразки позначені у стовпчиках ліворуч. Загальна кількість зразків позначена у стовпчиках праворуч

Зразки являли собою польовий матеріал різних типів (гризуни, кліщі, пелети, середовище). Найвищий відсоток позитивних результатів був отриманий для кліщів родини *Ixodidae*: *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* та *Dermacentor marginatus*. Також, позитивні результати були отримані при дослідженні зразків від гризунів видів *Mus musculus*, *Apodemus agrarius*, *Myodes glareolus* та у пелетах сови сірої (рис. 3.22).

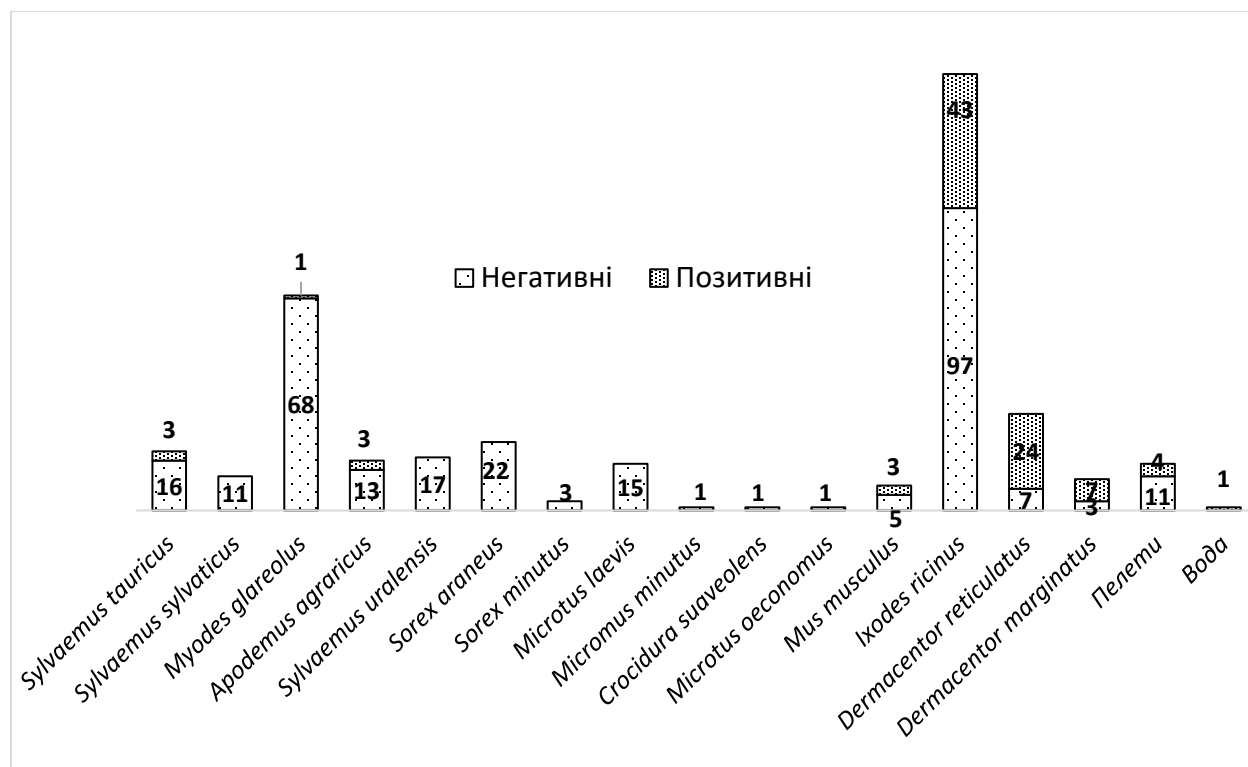


Рисунок 3.22 Розподіл зібраних зразків за типами та видами у Харківській області. Кількість позитивних зразків позначена на діаграмі у верхньому стовпчику, кількість негативних зразків – у нижньому стовпчику

### *Дніпропетровська область.*

Дніпропетровська область - це регіон, в якому не було зареєстровано підтверджених природних осередків туляремії. Однак, географічне положення області, її ландшафт, наявність річок та полів зі скирдами придатні для проживання гризунів та поширення інфекції. Саме через таку незрозумілу відсутність випадків туляремії серед людей та рідкісні випадки інфекції серед тварин цей регіон був обраний для дослідження (Офіційні дані Дніпропетровського обласного лабораторного центру).



Рисунок 3.23 Географічне розташування місць відбору зразків у Дніпропетровській області (зразки групуються за районами). Позитивні зразки позначені у лівому стовпчику. Загальна кількість зразків позначена у правому стовпчику

Для проведення цього дослідження було зібрано 105 проб з двох районів Дніпропетровській області: Петропавлівського (67 проб) та П'ятихатського району (38 проб). Лише два зразки (1,9%) показали позитивний результат щодо генетичного матеріалу збудника туляремії у ПЛР: зразок хвоста від гризуна *Apodemus agrarius*, зібраний у П'ятихатському районі поблизу села Червона поляна та зразок кліща *Dermacentor marginatus*, зібраний у Петропавлівському районі поблизу села Петропавлівка (рис. 3.23).

Всього було зібрано 105 зразків: хвости гризунів (52 зразки), кліщі *Dermacentor marginatus* (35 зразків), пелети *Strix aluco* (10 зразків), вода (6 зразків) та сіно (2 зразки) (рис. 3.24).



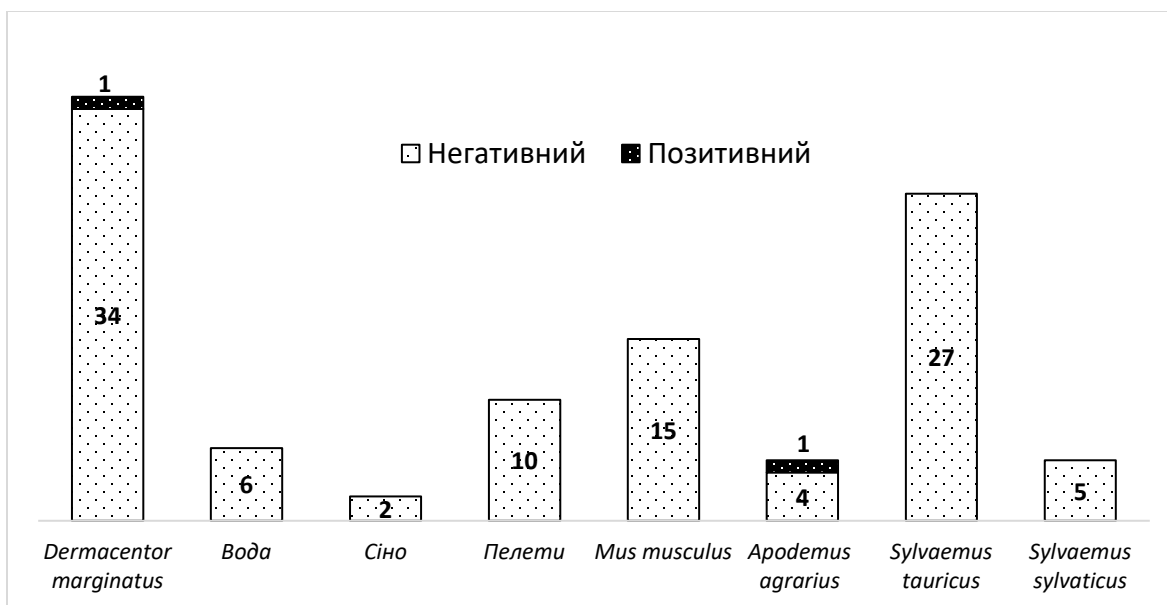


Рисунок 3.24 Розподіл зібраних зразків за типами та видами у Дніпропетровській області. Кількість позитивних зразків позначено на діаграмі у верхньому стовпчику, кількість негативних зразків – у нижньому стовпчику

#### *Миколаївська область*

У 1997-1998 роках у Миколаївській та Одеській областях було зареєстровано близько 100 випадків зараження людей туляремією. Цей спалах пов'язують з розвитком інфекції серед зайцеподібних та гризунів, які мешкали і мігрували по лісосмугах. Однак, цей спалах не був пов'язаний з районами, де знаходяться відомі осередки туляремії. У 2018 році у Вознесенському районі було виявлено випадок захворювання людини на туляремію, що, ймовірно, був пов'язаний із інфікуванням через укуси кліща (Офіційні дані Миколаївського обласного лабораторного центру).

У Миколаївській області було зібрано 501 зразок з території 7 районів: Вознесенський район (190 зразків), Вітовський район (106 зразків), Первомайський район (101 зразок), Снігурівський район (62 зразки),

Кривоозерівський район (34 зразки), Очаківський район (4 зразки), Березнегуватський район (4 зразки) (рис. 3.25).

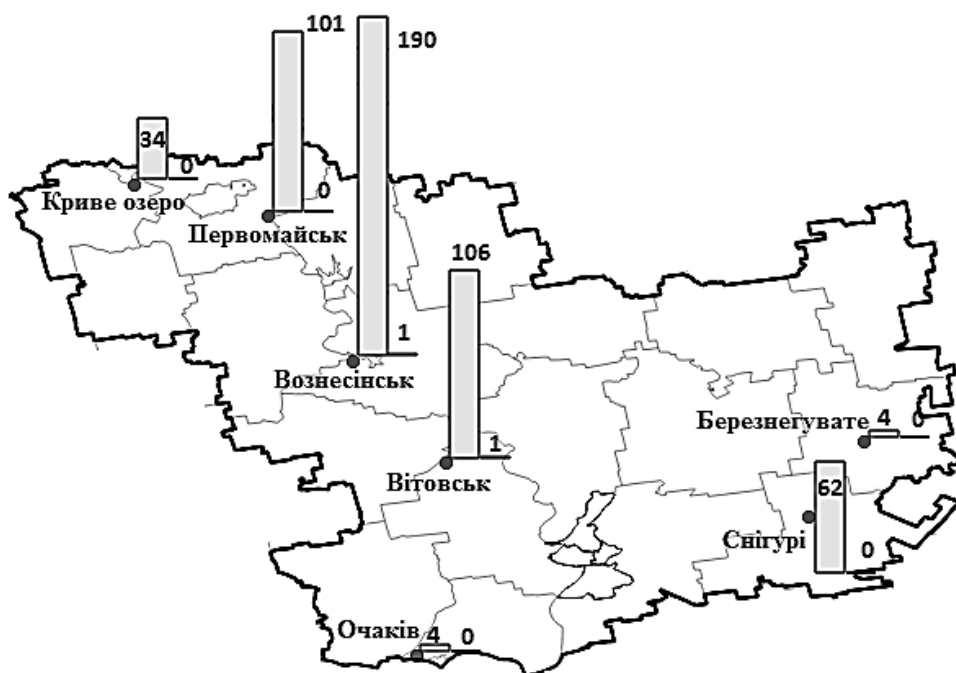


Рисунок 3.25 Географічне розташування районів відбору зразків у Миколаївській області (зразки групуються за районами). Позитивні зразки позначені у стовпчику зправа. Загальна кількість зразків позначена у стовпчику зліва

У цій області були досліджені лише хвости гризунів та, за виключеннями, гомогенати органів (17 зразків із Вознесінського району, 43 зразки із Вітовського району і 4 зразки із Очаківського району). З усіх досліджених зразків лише 2 були позитивними щодо генетичного матеріалу збудника туляремії (0,4%). Позитивні зразки належали гризунам видів *Sylvaeetus sylvaticus* та *Mus musculus* і були зібрані у Вітовському районі, с. Зелений гай, та у Вознесенському районі, с. Баштанка, відповідно (рис. 3.26).

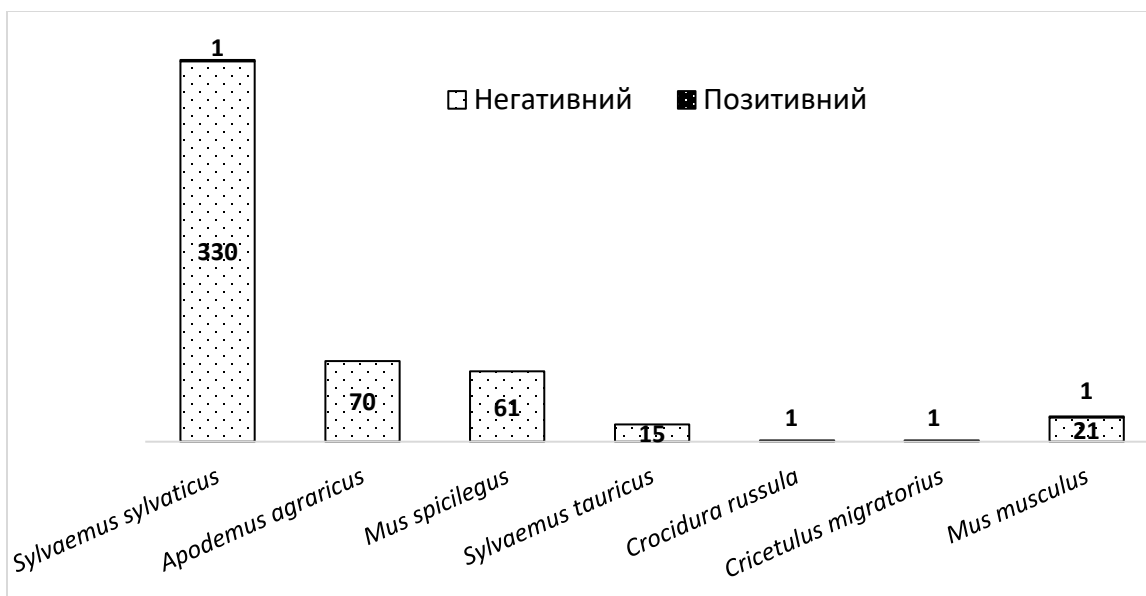


Рис.3.26 Розподіл зібраних зразків за видами та типами в Миколаївській області. Кількість позитивних зразків позначена на діаграмі у верхньому стовпчику, кількість негативних зразків – у нижньому стовпчику

Зразки від гризунів із Вознесінського району збирали одразу після підтвердження захворювання на туляремію чоловіка із с. Олександрівка в 2018 році [130]. Хоча Миколаївський обласний лабораторний центр повідомив про знаходження туляремійного антигену в кліщах із цього регіону, під час нашого дослідження генетичний матеріал *F. tularensis* від гризунів із с. Олександрівка не був знайдений. Проте, збудник туляремії був виявлений в одному випадку у матеріалі від гризуна із сусіднього села Баштанка, Вознесінського району.

#### *Аналіз відповідності (correspondence analysis)*

Для порівняння частоти виявлення *F. tularensis* у різних типах зразків ми провели аналіз відповідності із зразками з усіх трьох областей (рис. 3.27).



Рисунок 3.27 Результат аналізу відповідності (СА) для всіх зразків, згрупованих за видами чи типами матеріалів. Чим ближче назва типу зразка до напису «позитивний», тим вища частота виявлення *F. tularensis* у цьому типі зразка. Координати осі 1 (axis 1) показують зважені відстані між різними видами та групами, позначені на графіку крапками. Під «іншими» видами зразків зашифровані види: *M. spicilegus*, *C. suaveolens*, *C. migratorius*, *S. uralensis*, *M. laevis*, *S. araneus*, *S. minutus*, *M. minutus*, *M. oeconomus*, а також вода і сіно.

Аналіз відповідностей нашого дослідження показав, що кліщі родини *Ixodidae*, особливо *D. reticulatus* та *I. ricinus*, частіше переносять туляремійну інфекцію, ніж гризуни, що відповідає результатам попередніх досліджень на території України [14], [57].

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1) PCR based prevalence study of *Francisella tularensis* in Kharkiv, Dnipropetrovsk, and Mykolaiv oblasts during 2015–2018 / Zlenko O. B., Tkach G. E., Sukhorukova A.B., Kylypko L.V., Machota L. S., Ignatenkov O. S., Vinokurova K. V., Shamychkova G. R., Shtepa O. P., Rezykh V. G., Schwarz J., Duerr A., Popp C., von Buttlar H., Wolfel R., Solodiankin O.S., Gerilovych A. P. *J Vet Res.* 2020. Vol. 64, No 1. P. 63-71 [127]

2) Case report on the human infection with tularemia in Mykolaiv region, 2018 / Zlenko O.B., Ignatenkov O.S., Vinokurova K.V., Gerilovych A.P. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety.* 2020. Vol. 6, No 1. P. 15-17 [130]

#### **3.4. MLVA-генотипування ізолятів *F.tularensis*, виділених на території України впродовж 1997-2016 рр.**

З метою встановлення молекулярно-епізоотологічних характеристик 20 ізолятів *F.tularensis*, виділених на території України у 1997-2016 рр, та їх зв'язку з іншими типовими ізолятами *F.tularensis* було проведене MLVA-генотипування за 13 локусами [11], [12], [85].

До складу дослідженої панелі увійшли зразки з 11 областей України: Сумська, Чернігівська, Рівненська, Волинська, Львівська, Полтавська, Одеська, Кримська, Миколаївська, Запорізька, Вінницька. Зразки були зібрані співробітниками обласних лабораторних центрів від пацієнтів (3 зразки), гризунів (8 зразків), зайцеподібних (1 зразок), кліщів (6 зразків) та навколишнього середовища (2 зразки) (таблиця 3.2).

Таблиця 3.4

Перелік досліджуваних зразків, їх походження та дата збору

#	Інвентарний номер штаму	Звідки був виділений	Дата відбору зразка	Область
1	222	<i>Mus musculus</i>	18.05.1999	Кримський п/о
2	86	<i>Dermacentor reticulatus</i>	26.05.11	Чернігівська обл.
3	317	<i>Apodemus uralensis</i>	16.11.2010	Чернігівська обл.
4	138\15	Гніздо <i>Microtus arvalis</i>	28.04.1998	Миколаївська обл.
5	201	<i>Ixodes ricinus</i>	17.07.2006	Рівненська обл.
6	201	<i>Micromys minutus</i>	13.04.2005	Львівська обл.
7	205\15	Пунктат бубону	29.11.2000	Сумська обл.
8	103	<i>Apodemus agrarius</i>	31.03.1999	Полтавська обл.
9	456	<i>Mus spicilegus</i>	01.02.2000	Кримський п/о
10	21	Вода з р. Удай	04.03.2003	Полтавська обл.
11	128	Мізки <i>Lepus europaeus</i>	05.05.1998	Одеська обл.
12	523	сіно	29.12.1999	Чернігівська обл.
13	562\278o	<i>Sorex araneus</i>	05.11.2008	Сумська обл.
14	60	Невідомі кліщі	23.07.1997	Запорізька обл.
15	351\278o	Пунктат бубону	13.05.2005	Сумська обл.
16	37	<i>Hyalomma plumbeum</i>	13.05.1999	Кримський п/о
17	359\278o	Пунктат бубону	16.09.2005	Сумська обл.
18	493	<i>Myodes glareolus</i>	12.09.1996	Вінницька обл.
19	132	<i>Dermacentor reticulatus</i>	28.06.2016	Волинська обл.
20	66	<i>Dermacentor reticulatus</i>	10.06.2008	Рівненська обл.

Було встановлено, що всі ізоляти належать до одного підвиду *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, що узгоджується з даними МЕБ та ВООЗ щодо розповсюдження різних підтипів *F. tularensis* у світі. У межах цього підтипу було виділено три різних генотипічних кластери, названі нами відповідно до спорідненості цих кластерів із штамми сусідніх країн: російсько-азербайджанський (5 зразків), чехо-словацький (1 зразок) та європейський (14 зразків) кластери. Ці кластери позначені червоними колами (рис. 3.28).



Рисунок 3.28 MLVA-кластерний аналіз досліджуваних зразків методом попарного внутрішньогрупового невваженого середнього із середньоарифметичною кластеризацією

До європейського кластеру потрапила найбільша кількість зразків (14), що були виділені з усіх досліджених регіонів: Сумської, Чернігівської, Рівненської, Волинської, Львівської, Полтавської, Одеської, Кримської, Миколаївської, Запорізької, Вінницької (номера штамів 222, 86, 317, 138 \ 15, 201 (2 зразки), 205 \ 15, 103, 21, 128, 351 \ 278о, 359 \ 278о, 132, 66) областей. Українські зразки, що потрапили до цього кластеру, мали 100% ідентичність між собою та були споріднені до зразків з Польщі, Німеччини, Австрії,

Франції, Швеції, Російської Федерації та Азербайджану. Українські штами відрізнялись від цих споріднених штамів кількістю тандемних повторів у локусі FT-M03. Вони мали 23 тандемних повтори, в той час як інші штами мали 10, 15, 16, 17, 18, 19 та 24 тандемних повтори.

Російсько-азербайджанський кластер містив 5 ізолятів, що були виділені з Криму, Запорізької, Сумської та Вінницької областей (штами № 456, 60, 37, 562 / 278o, 493). Ізолятів відрізнялись між собою замінами в локусах FT-M04 (3 та 4 тандемні повтори) і FT-M20 (3 та 4 тандемні повтори) та були найбільш споріднені до ізолятів із Росії та Азербайджану. Відмінності між російськими та українськими ізолятами були виявлені у локусі FT-M03 (16 тандемних повторів в українських зразках і 18 у російських). Відмінності між азербайджанськими та українськими ізолятами були в локусах FT-M06 (4 повтори в українських ізолятах і 5 в азербайджанських) і FT-M03 (16 повторів в українських ізолятах і 17 в азербайджанських).

Один ізолят, що потрапив до чехо-словацького кластеру і був найбільш споріднений до ізолятів з колишньої Чехословаччини та Польщі, був виявлений на Чернігівщині за номером 523. Цей зразок відрізнявся від інших зразків, що також потрапили у цей кластер, 2 тандемними повторами у локусі FT-M06, замість 6 повторів.

Географічні розташування місць відбору зразків, з яких були ізольовані культури *F.tularensis*, вказані на рис. 3.29.





Рисунок 3.29 Географічна карта місць відбору досліджуваних зразків. Колір та форма позначок означає приналежність зразків до певних кластерів (червоні точки - європейський кластер, сині п'ятикутники – чехо-словацький кластер, зелені зірки - російсько-азербайджанський кластер)

Серед всіх генотипів найчастіше зустрічався генотип, пов'язаний з європейським кластером. Цей генотип був ізольований у 1996, 1998– 2000, 2003, 2005, 2006, 2008, 2010, 2011 та 2016 роках на територіях всіх досліджених регіонів України (рис. 3.30).

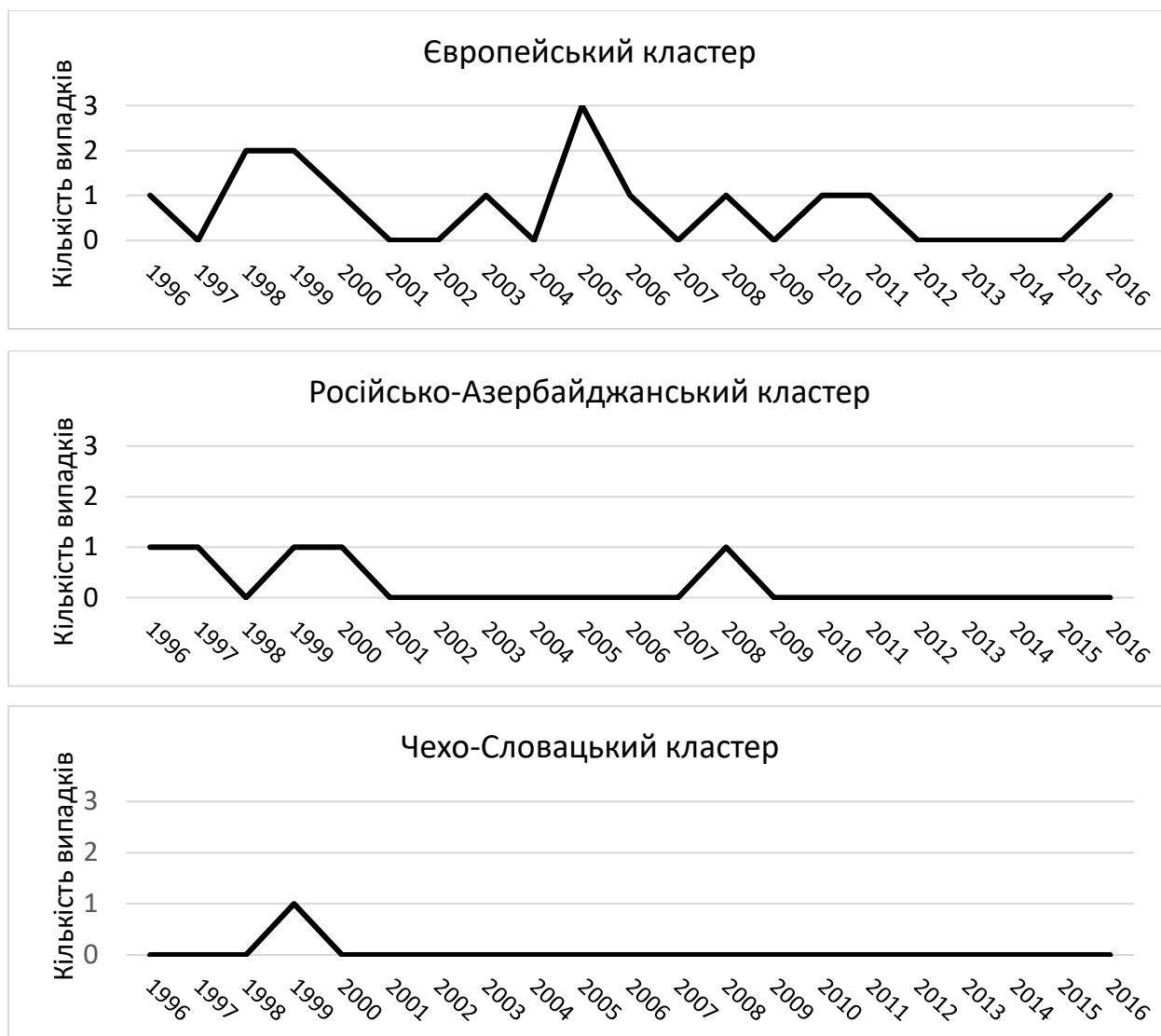


Рисунок 3.30 Розподіл досліджуваних зразків по кластерах за роками

Таким чином, нами встановлено провідний типовий український генотип, який поширюється на території всієї України, зберігається протягом років та пов'язаний з європейськими генотипами *Francisella tularensis*. Зразок, який був віднесений до Чехо-словацького кластеру, був виділений із сіна на Чернігівщині та, можливо, був випадково завезений до країни.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях*

1. Genotyping of *Francisella tularensis* isolates from Ukraine / Zlenko O. B., Durr A., Schwarz J., Vydaiko N. B., Gerilovych A. P. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2018. Vol. 4, No 4. P. 12-15 [128]

Таким чином, у даному розділі наведено результати досліджень щодо розробки, отримання та апробації рекомбінантних протеїнів *Francisella tularensis* для використання в якості антигенів у імуноферментному аналізі, рекомбінантного позитивного контролю для детекції збудника туляремії методом ПЛР, результати скринінгових досліджень серологічними та молекулярно-генетичними методами щодо місцезнаходження можливих природних осередків туляремії та MLVA-генотипування деяких ізолятів *F.tularensis*, виділених на території України.

## РОЗДІЛ 4

### ОБГОВОРЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Туляремія є зооносною бактеріальною висококонтагіозною особливо-небезпечною інфекцією. Україна є ендемічною територією щодо циркуляції туляремійного збудника. Починаючи із 1960-х років і до сьогодні, кількість масових спалахів туляремії серед людей в Україні скоротилася до значення близько 10 випадків на рік завдяки роботі протичумних станцій, а саме: викоріненню природних осередків методом дератизації та масовій вакцинації людей у природних осередках. На даний час, Центр громадського здоров'я та його територіальні органи і Обласні лабораторні центри МОЗ України фіксують активні природні осередки туляремії в 23 областях країни [14], [15], [57], [58], [98], [100], [103], [104].

На сьогодні в Україні бракує вітчизняних методологій та комерційних засобів серологічного контролю туляремії та виявлення генетичного матеріалу *F.tularensis* на основі ПЛР. Незважаючи на рідкісні випадки спалахів туляремії серед людей, наявність таких тест-систем вкрай важлива для проведення постійного епідеміологічного нагляду за природними осередками та швидкої діагностики захворювання у людей та тварин. Закордонні розробки не завжди є доступними та чимало коштують. Зазначене зумовлює необхідність конструювання рекомбінантного позитивного контролю для детекції генетичного матеріалу туляремії на основі ПЛР, розробки протоколу ПЛР з виявленням *F.tularensis* та отримання рекомбінантних антигенів для проведення серологічних досліджень щодо туляремії.

*Отримання рекомбінантних антигенів для виявлення антитіл до збудника туляремії у сироватках крові тварин і людей*

При розробці методу ІФА були обрані саме рекомбінантні антигени з декількох причин. По-перше, після отримання робочих клонів, такі антигени

дуже легко виготовляти в великих кількостях. По-друге, робота з клонами і їх зберігання цілком безпечні та не потребують складного обладнання та особливих заходів біобезпеки та біозахисту, на відміну від забезпечення процесів отримання ліпополісахаридних антигенів з живих культур *F.tularensis*. Таким чином, у якості антигенів були обрані протеїни FTT0077-2-оксоглутаратдегідрогеназа, компонент E2 дигідроліпоамід сукцинилтрансфери (SucB), FTT1696 - шаперон 60 (GroEl) та потенційний протеїн FTT0975.

Перші експерименти щодо клонування протеїнів з використанням експресуючого вектору pET26b(+) були незадовільними: очищення протеїнів з використанням системи очистки HIS-trap не дозволяло отримувати антигени належного ступеня очистки. Випробування протеїнів у ІФА демонструвало високі фонові значення оптичної щільності. Для коригування цієї проблеми, було обрано 4 інших вектори (pASG103, pASG105, pPSG103, pPSG105) з системою очистки Twin-Strep-tag®. Найкращі показники експресії протеїнів та росту в культурі були виявлені для клонів з використанням вектору pASG103.

Всі протеїни продемонстрували вищу активність та специфічність при дослідженні сироваток крові від свиней, ніж при дослідженні сироваток крові від людей.

Найвищий сигнал з найменшим фоновим значенням відносно позитивного контролю при проведенні непрямого ІФА продемонстрував рекомбінантний протеїн GroEl у концентрації 1,04 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток від свиней у 1:400 та при розведенні досліджуваних сироваток крові від людей 1:100. Цей протеїн відноситься до класу шаперонів (а саме, шаперонінів), також відомих як протеїни теплового шоку. Це один з найконсервативніших класів протеїнів, що експресується у прокаріот та еукаріот. Шапероніни є активаторами вродженого імунітету

[105]. Хоча більшість білків теплового шоку прийнято вважати клітинними білками, GroEL також може вивільнюватись з клітин і стимулювати розвиток імунної відповіді [106].

Протеїн SucB мав також високу реакційну здатність при дослідженні із сироватками крові від свиней і людей, а також він продемонстрував найкращі результати при дослідженні сироваток крові від людей: був більш реактивний ніж FTT0975 та мав нижчі фонові значення негативних контролів, ніж GroEL. Він також може використовуватись для загальнородової диференціації антитіл до збудників туляремії у свиней, але, після додаткових випробувань, він може мати вищу цінність при дослідженні сироваток крові від людей.

Гіпотетичний протеїн FTT0975 демонстрував найнижчий сигнал при дослідженні із сироватками крові від свиней. Крім цього, крос-рекативність з сироватками, позитивними щодо бруцел для протеїну FTT0975 була найвища. Тому, цей протеїн не було рекомендовано для проведення первинного серологічного скринінгу.

Результати дослідження отриманих рекомбінантних протеїнів відповідають результатам протеомічних досліджень *F. tularensis* Nakajima R. et al., та Kilmury S. і Twine S.M., під час яких панелі визначених протеїнів досліджували щодо антигенності і специфічності з сироватками від людей в реакції мікроаглютинації щодо виявлення антитіл до збудника туляремії. Протеїни GroEL, SucB та FTT0975 увійшли до 12 найбільш реактогенних білків *F.tularensis*, серед яких протеїн GroEL також продемонстрував найкращі результати: реакція мікроаглютинації з його використанням характеризувалася 100% чутливістю та 94% специфічністю при дослідженні сироваток від людей [107, 108].

Дослідження чутливості протеїнів GroEl та SucB у якості антигенів при проведенні ІФА продемонструвало 100% для обох протеїнів, що не відрізняється від результатів, отриманих у ІФА, розробленому Інститутом мікробіології Бундесверу.

Специфічність ІФА з протеїнами GroEl та SucB дорівнювала 75% і 75,5% відповідно, що перевищує значення специфічності для ІФА, розробленого Інститутом мікробіології Бундесверу (71%). Слід зазначити, що методи ІФА, порівнювані у даному дослідженні, відрізняються не тільки за антигенним складом. Розроблені в роботі методи відносяться до непрямого неконкурентного ІФА за типом детекції, в той час як розробка ІМБ відрізняється прямим конкурентним зв'язуванням антитіл до антигену. Конкурентний тип ІФА, зазвичай, відрізняється більш високою специфічністю, ніж неконкурентний, але для його проведення необхідне спеціальне і високовартісне конструювання моноклональних антитіл, специфічних саме до цільового антигену.

Враховуючи, що представлені в роботі методи неконкурентного ІФА є більш специфічними, ніж конкурентний ІФА ІМБ, ми припускаємо, що подальша розробка конкурентного ІФА з використанням антигенів SucB і GroEl є доцільною і може підвищити специфічність методу.

У досліді Sharma N et.al. (2013) наведено результати чутливості кІФА, заснованого на ліпополісахаридному антигені, що дорівнювала 94%; і специфічності - 98%. Дослід було проведено на 69 сироватках від пацієнтів, з яких 19 були клінічно підтверджені щодо туляремійної інфекції. Панельні зразки мали високі титри антитіл проти збудника туляремії, в той час як панельні зразки, протестовані в нашому дослідженні були відібрані від диких кабанів на різних етапах інфекційного процесу. Крім цього, дикі тварини за життя стикаються з більшою кількістю різноманітних інфекційних агентів,

антигенно-споріднених до *F.tularensis* (*Brucella* spp., *Yersinia* spp. та інші), ніж люди, тому сироватки від тварин можуть давати перехресні реакції з антигеном збудника туляремії, що, звичайно, ускладнює діагностику та знижує показники чутливості і специфічності методу [63]. У подальших дослідженнях [129], автори використовували розроблений метод також для аналізу серопревалентності антитіл проти збудника туляремії в Японії серед диких тварин (зайці, гризуни, ведмеді, лисиці та ін.). Автори зазначили, що вони підтверджували позитивні зразки методом вестерн-блотингу, але, нажаль, вони не навели скоригованих даних щодо специфічності та чутливості їх методу з використанням панелі зразків від тварин. У дослідженні було відмічено, що ліміт детекції методу становив 40% від коефіцієнту інгібування, в той час як у попередньому дослідженні ліміт детекції методу становив 8,6%, що підтверджує вищезазначену тезу відносно ускладненої діагностики антитіл проти збудника туляремії в сироватках від диких тварин.

Перевагою розроблених нами методів ІФА, окрім використання рекомбінантних технологій, є їх 100% чутливість. Однак, порівняння результатів чутливості і специфічності, отриманих під час наших досліджень з результатами більшості існуючих ІФА методів не є коректним, адже, зазвичай, чутливість та специфічність цих методів була розрахована з використанням панелей сироваток від людей, і рідше від тварин, що були відібрані під час гострої фази інфекційного процесу, і, відповідно мали високі титри антитіл.

Таким чином, нами було розроблено і отримано рекомбінантні антигени GroE1, SucB і FTT0975 *F. tularensis*, підтверджено ефективність їх використання в ІФА щодо антитіл проти збудника туляремії у сироватках від свиней (чутливість обох методів становила 100%, специфічність 75,5% для



ІФА, заснованого на протеїні SucB і 75% для ІФА, заснованого на протеїні GroEl), підтверджено їх антигенні властивості при дослідженні сироваток від людей, а також визначено оптимальні концентрації антигенів і сироваток для проведення досліджень. Протеїн GroEl у концентрації 1,04 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:100 від людей рекомендується для використання як антиген при проведенні непрямого ІФА для диференціації антитіл до *F. tularensis* без визначення підтипів. Протеїн SucB також може використовуватись для диференціації антитіл до збудників туляремії без визначення підтипів у концентрації 1,37 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:100 як від свиней, так і від людей. Протеїн FTT0975 у концентрації 2,73 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:50 від людей рекомендується для використання як антиген при проведенні непрямого ІФА для диференціації підтипів *F. tularensis*.

Для підвищення чутливості та специфічності серологічної діагностики з використанням розроблених рекомбінантних антигенів, вони можуть бути використані як антигени для проведення конкурентного ІФА.

Розроблені протеїни легко отримувати та очищувати при культивуванні клонів *E.coli* (носіїв рекомбінантних конструкцій) у стандартному LB-середовищі. Також, при роботі з рекомбінантними протеїнами відсутня необхідність підвищених заходів біобезпеки.

*Розробка рекомбінантного позитивного контролю для виявлення генетичного матеріалу збудника туляремії*

Наявність позитивного контролю для виключення можливості хибно-негативних результатів є обов'язковою складовою діагностичних досліджень. У якості позитивних контрольних зразків при проведенні ПЛР можуть бути використані культури збудника, надані референс-лабораторіями референтні

зразки ДНК, зразки, що раніше були охарактеризовані в даній лабораторії як позитивні, амплікони, що були напрацьовані на основі таких зразків, та рекомбінатні контрольні зразки.

Оскільки туляремія входить до переліку особливо небезпечних хвороб Всесвітньої організації з охорони здоров'я (ВООЗ) і передається, в тому числі і повітряним шляхом, вона може стати джерелом ураження лабораторного персоналу. Тому, робота з культурами збудника потребує оснащення лабораторії згідно відповідного рівня біологічного захисту. Використання у якості контрольного зразку ДНК, виділеної з позитивних зразків, а також напрацьованих на її матриці ампліконів обмежується нетривалим проміжком часу, протягом якого даний контрольний зразок є стабільним. Плазмідні позитивні контролю мають кращу стабільність при зберіганні завдяки замкненій кільцевій структурі. Вони є цілком безпечними, та їх можна використовувати у масштабному виробництві завдяки швидкому культивуванню трансформованих *E.coli* [7, 109].

Наразі, в Україні запатентована тест-система для визначення збудника туляремії, розроблена Стопчанською А.Г. та ін., де в якості позитивних контролів для ПЛР виступають виділені із живих культур і стандартизовані геномні ДНК різних штамів збудника туляремії [110]. З цих причин, нами була поставлена задача розробити саме рекомбінантний позитивний контроль для детекції збудника туляремії методом ПЛР.

У рекомендаціях МЕБ вказано один із форматів ПЛР, націлений на виявлення послідовностей гену *tul4* збудника туляремії, який кодує зовнішній мембранний протеїн цієї бактерії та є консервативним для всіх підвидів *F.tularensis*. Тому, для виготовлення рекомбінантного позитивного контролю нами була обрана праймерна система FT-FP, що є специфічною до гена *tul4*.

Отже, розроблений нами рекомбінантний позитивний контроль рTZ57F\_R\_FTFFP зі вставкою гена *tul4*, трансформований в клітини *E. coli* DH5 $\alpha$ , був успішно випробуваний як при проведенні класичної ПЛР, так і ПЛР у режимі реального часу. Поріг чутливості ПЛР з використанням розробленого контролю становив одну копію у мікролітрі, чи п'ять копій на реакцію.

*Дослідження сироваток від диких кабанів щодо наявності антитіл до F.tularensis та Brucella sp.*

Дикий кабан (*Sus scrofa*) є корінним видом у багатьох Європейських країнах. Щільність популяції диких кабанів в Україні коливається від 0 до 0,86 голів на квадратний кілометр [111]. Найвища щільність популяції спостерігається в лісистих частинах України, зокрема, у Поліссі. Копитні тварини – відомі резервуари *F.tularensis*. Перебіг хвороби у цих тварин безсимптомний, через що їм, на жаль, не приділяється належна увага. На відміну від гризунів та зайців, що є високосприйнятливими до інфекції і швидко гинуть після зараження, копитні тварини можуть лишатися носіями та поширювати інфекцію впродовж тривалого часу. Також, дикі кабани можуть вступати у статеві контакти з домашніми свинями, що знаходяться на вільному випасі, передавати інфекцію та підвищувати ризики ураження туляремією працівників ферм [35], [112]. Зараження диких кабанів збудником туляремії може відбуватися або під час контакту з інфікованими тваринами, або при потраплянні інфікованих мертвих тварин у воду, оскільки туляремія типу В зазвичай пов'язана з водним циклом поширення [8], [27].

За даними Центру громадського здоров'я МОЗ України, найбільш великі природні осередки туляремії розташовані у Чернігівській, Сумській та Хмельницькій областях. Тим не менш, деякі лісо-степові та степові райони, як Харківська, Одеська та Миколаївська області, також відомі як території з

постійними природними осередками збудника, що супроводжуються випадками туляремії, іноді навіть серед місцевих жителів.

Результати нашого дослідження узгоджуються з іншими даними про поширення туляремії в Україні. Більша частина зразків була зібрана в лісистих частинах країни, оскільки це найбільш типовий ареал мешкання дикого кабана. Найвищий відсоток позитивних зразків виявлений у Чернівецькій та Хмельницькій областях (50% та 41,2% відповідно). Ці регіони розташовані серед лісів з великою кількістю річок та періодичних повеней, які можуть бути джерелом передачі туляремії. Також, досить високий відсоток позитивних зразків було виявлено у Чернігівській (33,3%) і Харківській областях (21%).

Дослідження серопревалентності щодо туляремії серед копитних тварин, включаючи кабанів, дуже слабо описані у світовій літературі. За результатами серологічних досліджень серед диких кабанів, що проводились у деяких країнах Європи, позитивні щодо туляремії показники варіюють від 1,9 до 10%. Найвищий (17%) показник поширеності антитіл до туляремії у кабанів був виявлений протягом 1993–1994 р. перед початком спалаху туляремії в Південній Моравії в 1994 р. При порівнянні, відсоткові значення серопревалентності у Чернівецькій, Чернігівській, Хмельницькій та Харківській областях значно вищі. Якщо взяти для порівняння дослідження Dahouk S. A. et.al., проведене аналогічними методами, можна побачити аналіз тільки території Західної Померанії (23174 км<sup>2</sup>), з якої було досліджено всього 763 сироватки, в той час як наше дослідження має схожий об'єм вибірки (707 сироваток), але охоплює майже всю Україну (площа однієї Чернігівської області – 31865 км<sup>2</sup>). У такому випадку, порівнювати відсоткові значення цих досліджень некоректно. Те ж саме можна сказати і про порівняння з дослідженнями у Південній Моравії: окрім значущої різниці у вибірці та площі, охопленої при проведенні двох досліджень, у дослідженні

використовували реакції мікроаглютинації та фіксації компліменту, що мають інші показники чутливості та специфічності [41], [42], [113]. Тим не менш, наші дослідження підтвердили активний стан вже відомих осередків у Чернівецькій, Хмельницькій, Харківській та інших областях. Високий загальний відсоток серопозитивних зразків (12,3%) є предвісником погіршення епізоотичного благополуччя щодо туляремії.

За рекомендаціями ВООЗ та МЕБ, золотим стандартом серологічного підтвердження *F.tularensis* є вестерн-блотинг [3], [7]. Під час нашого дослідження сироваток щодо антитіл до збудника туляремії, 268 сироваток з 707 були позитивні у методі ІФА, із яких методом вестерн-блотингу було підтверджено 87 зразків. Відомо, що ліпополісахаридні антигени *F.tularensis* можуть демонструвати перехресну реакцію з антитілами бактерій *Brucella spp.*, *Yersinia spp.* та інших. Тому, було вирішено дослідити ІФА-хибнопозитивні сироватки щодо вмісту антитіл проти *Brucella spp.*

За даними Алексеєвої Г. Б. та ін., серопревалентність антитіл до збудника бруцельозу серед диких кабанів у 2013-2014 р. в Україні становила близько 14% (при проведенні досліджень методом Роз-бенгал) та доходила до 29% (при проведенні досліджень у реакції зв'язування комплементу) [114]. Наше дослідження охоплювало близький за роками період (2011-2013 рр.). Нами було виявлено нижчу серопревалентність антитіл до бруцельозу – 20,1%. По-перше, така різниця в результатах може бути пов'язана з методами, обраними для проведення цих досліджень, оскільки Роз-бенгал-тест, реакція зв'язування комплементу та ІФА мають різні показники специфічності та чутливості, що залежать від безлічі факторів, включаючи походження антигенів, що використовуються в реакціях [115]-[118]. Однак, позитивні щодо *F.tularensis* сироватки не були досліджені щодо антитіл до збудника бруцельозу, що також вплинуло на загальну кількість позитивних результатів.

Найвищий відсоток позитивних зразків на бруцельоз був відмічений в Луганській області (76 позитивних зразків із 94, або 80,9%). Ця область межує з Російською Федерацією, де бруцельоз є поширеним захворюванням не тільки серед диких тварин, а навіть і серед сільськогосподарських тварин [119]. Кабани мігрують з території Російської Федерації в Україну в тому числі і через Луганську область, що може бути причиною поширення бруцельозу в цій області. Згідно з повідомленнями Центру громадського здоров'я МОЗ України, у 2013 р. на Луганщині стався випадок зараження людини бруцельозом. Дослідження показало, що пацієнт був заражений під час роботи на фермі у Воронежській області, Російська Федерація [97].

Отже, копитні тварини – це відомі резервуари збудників туляремії та бруцельозу, але, на жаль, вони залишилися без належної уваги. В нашому дослідженні 12,3% досліджуваних зразки були серопозитивні до туляремії і 20,1 % - до бруцельозу, що демонструє їх циркуляцію серед диких кабанів та ймовірність передачі домашнім свиням на вільному випасі, що може підвищувати ризики професійного інфікування [35], [112].

*Дослідження зразків від гризунів, кліщів та об'єктів довкілля щодо наявності генетичного матеріалу *F.tularensis* у Харківській, Миколаївській та Дніпропетровській областях*

Полімеразна ланцюгова реакція - швидкий і високочутливий метод виявлення геному збудників інфекційних хвороб в різних типах зразків. Він може бути використаний для вивчення патологічного матеріалу, векторів, пелет та зразків навколишнього середовища, включаючи воду, бруд, тощо. Ми провели збір кліщів родини *Ixodidae*, пелет сови сірої, води та сіна, що є типовими зразками для вивчення туляремії. Ці типи матеріалів безпечні як при відборі, так і при проведенні наступних робіт [7], [120]. Гризуни - відомі носії туляремії, які відіграють велику роль у формуванні природних осередків. Для

отримання високих концентрацій матеріалу і виявлення туляремії у гризунів зазвичай для аналізу беруть внутрішні органи, де локалізується *F. tularensis*. Це може бути селезінка, легені, серце або їх суміш. Однак розтин інфікованих туляремією тварин є небезпечною процедурою, яка потребує спеціального обладнання, рівнів безпеки та захисту лабораторії, а також відповідних дозволів.

Таким чином, з міркувань біобезпеки, ми вирішили провести ПЛР-аналіз хвостів гризунів, оскільки метод ПЛР дозволяє виявити навіть одну копію генетичного матеріалу у зразку. Деякі зразки, що надходили з обласних лабораторних центрів як підготовлені гомогенати органів, також були включені в це дослідження. Нами була проведена оптимізація методики виділення ДНК із хвостів гризунів. Дослідження показали, що хвости гризунів є придатним матеріалом для виявлення *F. tularensis* за допомогою ПЛР, і їх можна використовувати, якщо розтин тварини неможливий з будь-яких причин.

Як було зазначено вище, найбільший відсоток позитивних зразків (48 позитивних із 53 зібраних, або 90,6%) було зібрано в околицях села Газове, Богодухівського району Харківської області. Однак, цей факт не є точною ознакою активного осередку туляремії. З цієї точки були відібрані лише кліщі, і 51% із них належав до роду *Dermacentor* spp. Кліщі родини *Ixodidae*, особливо роду *Dermacentor*, частіше переносять *F. tularensis*, ніж інші потенційні організми-носії. Для території України цей факт відомий з 1964 року, коли Ступницька В. М. та ін. [57] включили кліщів *D. reticulatus* та *I. ricinus* до основних переносників та резервуарів туляремійної інфекції разом із водяними щурами. Ці тези були підтверджені у ретроспективному аналізі J. Hightower та ін. [14], де з 2400 позитивних на *F. tularensis* зразків 25,5% були

виділені з *D. reticulatus*, 12,7% - з *D. marginatus*, 5,8% - з *I. ricinus* та 22% - з 23 видів гризунів.

Для підтвердження вищезазначеної тези і перевірки частоти виділення генетичного матеріалу із різних типів зразків нами було проведено аналіз відповідностей, який показав, що кліщі родини *Ixodidae*, особливо *D. reticulatus* та *I. ricinus*, частіше переносять збудника туляремії, ніж гризуни, що відповідає попереднім дослідженням на території України [14, 57]. Існує ряд досліджень *D. reticulatus* та *I. ricinus* щодо їх носійства туляремії в сусідніх Польській та Чеській Республіках, які демонструють високий показник виявлення *F. tularensis*, особливо в кліщах виду *D. reticulatus*, і менший показник в кліщах виду *I. ricinus* [27, 120-122].

Дослідження в Грузії [123] також показали, що кліщі роду *Dermacentor* є важливими носіями *F. tularensis* (в Грузії *D. marginatus* є превалюючим видом над *D. reticulatus*), але кліщі *I. ricinus* не грають такої великої ролі, порівняно з Україною. Цікаво, що в Грузії найчастіше виділяли *F. tularensis* від гризунів *M. arvalis*. Хоча цей вид гризунів, на жаль, відсутній у нашому дослідженні, *M. arvalis* також є відомими носієм туляремії в Україні. Тим не менш, не зважаючи на меншу значимість гризунів як носіїв збудника туляремії у нашому дослідженні, вивчення циркуляції цього збудника серед гризунів також важливе для кращого розуміння епідеміологічного процесу *F. tularensis*, адже зараження людей найчастіше відбувається саме при контакті з інфікованими тваринами. Русев та ін. [103] роблять припущення, що одним з факторів стабільності природних осередків може бути контакт кліщів з гризунами - потенційними носіями туляремійної інфекції.

Дослідження пелети також продемонструвало можливість зберігання генетичного матеріалу збудника туляремії. Однак вибірка в нашому дослідженні є дуже неоднорідною, і вона включає деякі види (наприклад, *M.*



*oesonotus*) та типи матеріалу (наприклад, сіно), які були зібрані в невеликій кількості. Тому для проведення більш глибокого аналізу та правильних висновків необхідне продовження досліджень.

Таким чином, епідеміологічний нагляд за дикою природою необхідний для ідентифікації природних осередків туляремії, прогнозування та забезпечення заходів щодо запобігання спалахів. Було проведено дослідження трьох областей: Харківської (n = 380), Дніпропетровської (n = 105) та Миколаївської (n = 501), де ми збрали матеріал, потенційно заражений *F. tularensis*: кліщі (n = 216), хвости гризунів (n = 736), пелети (n = 25), сіно (n = 2), вода (n = 7). У Харківській області 23% зібраних зразків були позитивними щодо генетичного матеріалу збудника туляремії, у Дніпропетровській області - 1,9% зібраних зразків були позитивними, а в Миколаївській області - 0,4% зразків позитивними щодо цього збудника. Однак, великий відсоток позитивних зразків у Харківській області можна пояснити не лише наявністю активних осередків, а й різним співвідношенням зібраних типів зразків: з цієї області була відібрана найбільша кількість кліщів (n = 181). Аналіз відповідностей видів та типів зразків підтвердив, що найчастіше носіями *F. tularensis* були кліщі *D. reticulatus* та *I. ricinus*: 74,2% та 29,3% відповідно були позитивними. Через причини біобезпеки ми, за рідкісним виключенням, проводили дослідження хвостів гризунів у ПЛР і вважаємо, що цей матеріал є адекватною заміною стандартного дослідження їх органів у випадку, якщо розтин тварини з будь-якої причини неможливий. Наявні на сьогодні епідеміологічні дані не можуть відобразити всю картину екології туляремії в Україні. Моніторинг відомих та пошук нових природних вогнищ повинен бути неперервним для поглиблення знань про епідеміологічні процеси туляремії в Україні.

*MLVA-генотипування ізолятів F.tularensis, виділених на території України впродовж 1997-2016 рр.*

Дослідження нуклеотидних послідовностей генетичного матеріалу інфекційних збудників дозволяє визначати їх генетичні особливості, на базі чого можна робити висновки про походження збудника, вірулентність та визначати інші характеристики, що стануть основою для подальшого створення ефективних засобів профілактики, визначення епідеміологічного стану та створення програм контролю захворювання та поширення збудника.

Найбільш оптимальним підходом для дослідження геномів збудників інфекційних хвороб (а також і всіх інших живих організмів) є повногеномне секвенування, що дозволяє отримати всю можливу інформацію про об'єкт дослідження. Однак, наразі, повногеномне секвенування залишається дуже дорогою методикою, що робить її недоступною широкому колу науковців.

Генотипування є більш доступним альтернативним методом порівняння ізолятів між собою. Для визначення генотипічних характеристик, а також частоти зустрічаємості і розподілу окремих генотипів збудника туляремії золотим стандартом є MLVA-генотипування (Multi-locus variable number tandem repeat). Цей метод також називають «аналізом відбитків пальців» за його можливість розрізнити між собою навіть дуже схожі штами, що неможливо зробити іншими методиками генотипування [11, 12, 85].

Досліджувана нами панель включала 20 зразків, які були обрані випадковим чином для MLVA-аналізу. Ця панель досить невелика, але вона включала зразки, зібрані протягом різних років з різних регіонів України. Така варіативність вибірки дає можливість попередньої обробки отриманих даних у часі та просторі. Враховуючи ці умови, нами був визначений «європейський» генотип, який притаманний 70% досліджуваних зразків і зустрічався майже кожен досліджуваний рік з 1996 по 2016.

В Україні MLVA-генотипування 197 місцевих ізолятів було проведене Нехороших З. М та співавторами, де ізоляти були типовані за чотирма локусами: FT-M3, FT-M6, FT-M19 і FT-M20 [104]. У нашому дослідженні зразки були типовані за більшою кількістю маркерів: Ft-M023, Ft-M03, Ft-M22, Ft-M24, Ft-M20A, Ft-M10, Ft-M05, Ft-M26, Ft-M04, Ft-M20B, Ft-M06, Ft-M02. Ми не проводили досліджень з локусом FT-M19, так як згідно з дослідженнями Johansson et.al., цей локус, зазвичай, є низьковаріабельним серед ізолятів підтипу *F. tularensis* subsp. *holarctica*, до якого відносились всі досліджувані нами зразки [11]. У дослідженні Нехороших З.М. різні генотипи були об'єднані в три великі групи, умовно названі А, В, С. Деякі підтипи групи генотипів А (А8, А12, А16) були розповсюджені у всіх ландшафтно-географічних зонах країни, що також підтверджує результати наших досліджень щодо наявності на території України превалюючого генотипу [98, 104].

Виходячи з цього, за результатами наших досліджень можна сказати, що ми знайшли провідний генотип, який розповсюджений на території всієї України та споріднений з європейськими генотипами *Francisella tularensis*.

## ВИСНОВКИ

1. У дисертаційній роботі на підставі проведеного комплексу епізоотологічних, молекулярно-генетичних, молекулярно-біотехнологічних, серологічних, філогенетичних, біоінформатичних та математико-статистичних досліджень вивчено епізоотичну ситуацію в Україні щодо туляремії та удосконалено систему її лабораторної діагностики за рахунок впровадження методик на основі полімеразної ланцюгової реакції і імуноферментного аналізу.

2. На основі проведених досліджень були отримані три рекомбінантні протеїни *F.tularensis* (GroEl, FTT0975, SucB), підтверджено ефективність їх використання у якості антигенів в ІФА щодо антитіл проти збудника туляремії у сироватках від свиней (чутливість обох методів становила 100%, специфічність 75,5% для ІФА, заснованого на протеїні SucB і 75% для ІФА, заснованого на протеїні GroEl), підтверджено їх антигенні властивості при дослідженні сироваток від людей, а також визначено оптимальні концентрації антигенів і сироваток для проведення досліджень. Протеїн GroEl у концентрації 1,04 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:100 від людей рекомендується для використання як антиген при проведенні непрямого ІФА для загальнородової диференціації антитіл до *F. tularensis*. Протеїн SucB також може використовуватись для загальнородової диференціації антитіл до збудників туляремії у концентрації 1,37 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:100 як від свиней, так і від людей. Протеїн FTT0975 у концентрації 2,73 мкг/мл при розведенні досліджуваних сироваток 1:200 від свиней та 1:50 від людей рекомендується для використання як антиген при проведенні непрямого ІФА для диференціації підтипів *F. tularensis*.

3. На основі проведених досліджень був сконструйований позитивний контрольний зразок на основі плазмідного вектору рTZ57F\_R\_FTFF та зі вставкою гена *F.tularensis tul4* довжиною 103 п.н. Доведена можливість використання вектору в якості позитивного контрольного зразку для визначення генетичного матеріалу збудника туляремії методом ПЛР та ПЛР у реальному часі з аналітичною чутливістю реакції – одна копія в мікролітрі (п'ять копій на реакцію).

4. За результатами молекулярно-генетичних досліджень щодо скринінгу генетичного матеріалу збудника туляремії встановлено, що в Харківській області (n = 380) 23% відібраних зразків були позитивними, у Дніпропетровській області (n = 105) 1,9%, і в Миколаївській області (n = 501) 0,4%. Всього було зібрано 216 зразків кліщів, 736 зразків від гризунів, 25 пелет, 2 зразки сіна, 7 зразків води. За результатами аналізу відповідностей, найчастіше збудника туляремії виявляли у кліщах *D. reticulatus* та *I. ricinus* (*Ixodidae*) (74,2% і 29,3% відповідно).

5. За результатами серомоніторингу диких кабанів України щодо туляремії, виявлено 87 (12,3 %) серопозитивних тварин з 701 досліджених. Основна кількість позитивних зразків припала на Чернівецьку (33,9 %) та Хмельницьку (30,6 %) області. Також, непідтверджені у вестерн-блотингу сироватки були досліджені на бруцельоз, з яких 142 були позитивні (20,1 %).

6. За результатами MLVA-типування 20 ізолятів *F. tularensis*, встановлено, що всі вони належать до голарктичного підтипу. Було виявлено підтип, що циркулює на всій території України впродовж 10 років, до нього належало 14 ізолятів (штами № 222, 86, 317, 138 \ 15, 201 (2 зразки), 205 \ 15, 103, 21, 128, 351 \ 278o, 359 \ 278o, 132, 66). Один зразок (штам №523), споріднений за тандемними повторами із зразками з території колишньої Чехословаччини,

був виділений із сіна на Чернігівщині та, можливо, був випадково завезений до країни.

**ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ**

1. Oyston P., Sjostedt A., Titball R. Tularemia: bioterrorism defense renews interest in *Francisella tularensis*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004. Vol. 2, № 12. P. 967–979.
2. Tularemia. In: *Zoonoses*. / Pearson A. et.al. New York: Oxford University Press. 1998. P. 303–312.
3. World Organization for Animal Health [OIE]. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [online]. 2008. Paris: OIE. URL: [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.18\\_TULAREMIA.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.18_TULAREMIA.pdf). 2 (Last accessed: 30.08.19)
4. Hopla C.E. The ecology of tularemia. *Adv Vet Sci Comp Med*. 1974. Vol. 18. P. 25–53
5. Sjostedt A. Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007. Vol. 1105, № 1. P. 1–29. DOI: 10.1196/annals.1409.009
6. *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential Agent of Biowarfare / McLendon M. K. et.al. *Annual Review of Microbiology*. 2006. Vol. 60, № 1. P. 167–85. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142126
7. WHO Guidelines on tularemia / Edited by A. Tärnvik. Geneva: WHO Press, 2007. 115 p.
8. The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review / Hestvik G. et al. *Epidemiology and Infection*. 2015. Vol. 143, № 10. P. 2137–2160. DOI: 10.1017/S0950268814002398
9. Agglutinins and antibodies to *Francisella tularensis* outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of tularemia / L. Bevanger,

J.A. Macland, A.I. Naess . *Journal of clinical microbiology*. 1988. Vol. 26, № 3 P. 433–437.

10. Tularemia in Denmark: Identification of a *Francisella tularensis* subsp. holarctica Strain by Real-Time PCR and High-Resolution Typing by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis / Bystrom M. et.al. *Journal of clinical microbiology*. 2005. Vol. 43, № 10. P. 5355–5358. DOI: 10.1128/JCM.43.10.5355-5358.2005

11. Worldwide Genetic Relationships among *Francisella tularensis* Isolates Determined by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis / Johansson A. et.al. *Journal of bacteriology*. 2004. V.186, № 17. P. 5808–5818. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004

12. *Francisella tularensis* Strain Typing Using Multiple-Locus, Variable-Number Tandem Repeat Analysis / Farlow J. et.al. *Journal of clinical microbiology*. 2001. Vol. 39, № 9. P. 3186–3192. DOI: 10.1128/jcm.39.9.3186-3192.2001

13. Межжерин С.В., Лашкова Е.И., Товпинец Н.Н. Географическое распространение, численность и биотопическое распределение лесных мышей рода *Sylvaemus* (*Rodentia*, *Muridae*) на территории Украины. *Вестник зоологии*. 2002. № 36, т.6. С.39-49.

14. Historical distribution and host-vector diversity of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia, in Ukraine / Hightower J. et.al. *Parasites and Vectors*. 2014. Vol. 7, № 453. P. 453 – 458. DOI: 10.1186/s13071-014-0453-2

15. Наглов В. Значение видов мелких млекопитающих в эпизоотиях туляремии на территории Харьковской области. *Праці Теріологічної Школи*. 2014. Т. 12. С. 47–55.



16. Methods for Enhanced Culture Recovery of *Francisella tularensis* / Petersen J.M. et.al. *Applied and environmental microbiology*. 2004. Vol. 20, № 6. P. 3733-3735. DOI: 10.1128/AEM.70.6.3733-3735.2004
17. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. / Larsson P. et. al. *Nat. Genet.* 2005. Vol. 37. P. 153–159. doi: 10.1038/ng1499
18. Complete genome sequence of a *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strain from Germany causing lethal infection in common marmosets / Antwerpen M. H. et. al. *Genome Announc.* 2013. Vol. 1, №1 P. e00135. doi: 10.1128/genomeA.00135-12
19. Genome sequence of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* strain FSC200, isolated from a child with tularemia / Svensson K. et. al. *J. Bacteriol.* 2012. Vol. 24, № 194. P. 6965–6966. doi: 10.1128/JB.01040-12
20. Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish / Sjödin A. et. al. *BMC Genomics*. 2012. Vol. 13, № 268. doi: 10.1186/1471-2164-13-268
21. Kingry L. C., Petersen J. M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014. Vol. 13, № 4. doi: 10.3389/fcimb.2014.00035
22. Gunnell M. K., Adams B. J., Robison R. A. The Genetic Diversity and Evolution of *Francisella tularensis* with Comments on Detection by PCR. *Curr Issues Mol Biol.* 2016. Vol. 18. P. 79-91.
23. GroEL and Lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain Synergistically Activate Human Macrophages / Noah C.E. et.al. *Infect. Immun.* 2010. Vol. 78, № 4. P.1797–1806. DOI: 10.1128/IAI.01135-09

24. Possible Links Between Stress Defense and the Tricarboxylic Acid (TCA) Cycle in *Francisella* Pathogenesis / Dieppedale J. et al. *Mol. Cell Proteomics*. 2013. Vol. 12, № 8. P. 2278–2292. DOI: 10.1074/mcp.M112.024794
25. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS. Sandstrom G. et al. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1992. Vol. 5. P. 201–210
26. Petersen J.M., Mead P.S., Schriefer M.E. *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Veterinary Research*. 2008. Vol. 40, № 2. P. 9. DOI: 10.1051/vetres:2008045
27. Hubalek Z, Sixl W, Halouzka J, Mikulaskova M. Prevalence of *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in adjacent areas of the Czech and Austrian Republics. *Cent Eur J Public Health*. 1997. Vol. 5, № 4. P. 199 – 201.
28. Warring W.B., Ruffin J.S. A tick-borne epidemic of tularemia. *N. Engl. J. Med.* 1946. Vol. 234. P. 137–140. doi: 10.1056/NEJM194601312340501
29. *Francisella tularensis*: No Evidence for Transovarial Transmission in the Tularemia Tick Vectors *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes Ricinus* / Genchi M. et al. *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 8. P. 1 – 13. doi:10.1371/journal.pone.0133593
30. Mani R.J., Clinkenbeard K.D. Transstadial transmission and maintenance of *Francisella tularensis* in the Blacklegged Tick *Ixodes scapularis*. *J Parasit Dis Diagn Ther*. 2018. Vol. 3, № 2. P. 5-10. doi: 10.4066/2591-7846.1000026
31. Gerhart J.G., Moses A.S., Raghavan R. A *Francisella*-like endosymbiont in the Gulf Coast tick evolved from a mammalian pathogen. *Sci Rep*. 2016. Vol. 6. P. 33670. doi:10.1038/srep33670
32. Goethert H. K., Telford S. R. A New *Francisella* (Beggiatiales: Francisellaceae) Inquiline within *Dermacentor variabilis* Say (Acari:

Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 2005. Vol. 42, № 3. P. 502–505. doi: 10.1093/jmedent/42.3.502

33. *Francisella*-Like Endosymbiont DNA and *Francisella tularensis* Virulence-Related Genes in Brazilian Ticks (Acari: Ixodidae) / Machado-Ferreira E. et.al. *Journal of Medical Entomology*. 2009. Vol. 46, № 2. P. 369–374. doi:10.1603/033.046.0224

34. *Francisella tularensis* in the United States / Farlow J. et.al. 2005. *Emerg Infect Dis*. 2005. Vol. 11, № 12. P. 1835–1841. doi: 10.3201/eid1112.050728

35. The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. / Eliasson H. et.al. *Emerg Infect Dis*. 2002. Vol. 8, № 9. P. 956–960. doi:10.3201/eid0809.020051

36. Outbreaks of tularemia in a boreal forest region depends on mosquito prevalence / Ryden P. et al. *J Infect Dis*. 2012. Vol. 205, № 2. P. 297–304. doi:10.1093/infdis/jir732

37. Ulceroglandular tularemia in a toddler in Germany after a mosquito bite. Hanke C.A. et al. *Eur J Pediatr*. 2009. Vol. 168, № 8. P. 937 – 940. doi:10.1007/s00431-008-0862-3

38. Transmission of tularemia from a water source by transstadial maintenance in a mosquito vector / Bäckman S. et. al. *Sci. Rep*. 2005. Vol. 5. P. 7793. doi: 10.1038/srep07793

39. Tularemia of European Brown Hare (*Lepus europaeus*): A Pathological, Histopathological, and Immunohistochemical Study / Gyuranecz M. et.al. *Vet Pathol*. 2010. Vol. 47, № 5. P. 958 - 963. doi: 10.1177/0300985810369902.

40. Олсуфьев Н. Г., Дунаева Т.Н. Природная очаговость, эпидемиология и профилактика туляремии. Москва, 1970. 272 с.

41. Seroprevalence of Brucellosis, Tularemia, and Yersiniosis in Wild Boars (*Sus scrofa*) from North-Eastern Germany / Dahouk A. L. et. al. *J Vet Med B Infect*

*Dis Vet Public Health*. 2005. Vol. 52, № 10. P444 - 55. doi: 10.1111/j.1439-0450.2005.00898.x

42. Serological survey of the wild boar (*Sus scrofa*) for tularaemia and brucellosis in South Moravia, Czech Republic / Hubalek Z. et. al. *Veterinární medicína*. 2002. Vol. 47, № 47. P. 3 – 60. doi: 10.17221/5805-VETMED

43. Geiger J. C. Tularemia in cattle and sheep. *Cal West Med*. 1931. Vol. 34, № 3. P:154-6.

44. Zargar A., Maurin M., Mostafavi E. Tularemia, a re-emerging infectious disease in Iran and neighboring countries. *Epidemiol Health*. 2015. Vol. 37. P. e2015011. doi:10.4178/epih/e2015011

45. Tularemia in two cats / Woods J. P. et.al. *J Am Vet Med Assoc*. 1998. Vol. 212, №1. P.81 – 83.

46. Acute tularemia in three domestic cats / Baldwin C. J. et. al. *J Am Vet Med Assoc*. 1991. Vol. 199, №11. P. 1602 - 1605

47. Tularemia in a cat / Rhyan J.C. et.al. *J Vet Diagn Invest*. 1990. Vol. 2. P. 239 – 241.

48. Capellan J., Fong I. W. Tularemia from a Cat Bite: Case Report and Review of Feline-Associated Tularemia. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 16, № 4. P. 472–475. doi:10.1093/clind/16.4.472

49. Meinkoth K. R., Morton R. J., Meinkoth J. H. Naturally occurring tularemia in a dog. *JAVMA*. 2004. Vol. 225, №. 4. P. 545-547. doi: 10.2460/javma.2004.225.545

50. *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in Ringtail Possums, Australia / Eden J.S. et.al. *Emerg Infect Dis*. 2017. Vol. 23, № 7. P. 1198–1201. DOI: 10.3201/eid2307.161863

- 51.Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia / Whipp M.J. et. al. *J Med Microbiol.* 2003. Vol.52, № 9. P. 839 – 842. DOI: 10.1099/jmm.0.05245-0
- 52.*Francisella tularensis* subspecies *holarctica*, Tasmania, Australia, 2011 / Jackson J et. al. *Emerging Infectious Diseases.* 2012. Vol. 18, № 9. P. 1484 – 1486. DOI: 10.3201/eid1809.111856
- 53.Эпидемиологический и эпизоотологический анализ ситуации по туляремии в Российской Федерации в 2016 г., прогноз на 2017 г. / Кудрявцева Т.Ю. и др. *Медицина и здравоохранение.* 2017. №2. С. 13 – 18. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-13-18
- 54.Petersen J.M., Schriefer M.E. Tularemia: emergence/re-emergence. *Veterinary Research.* 2005. Vol. 36, № 3. P. 455-467. DOI: 10.1051/vetres:2005006
- 55.Natural tularemia foci on the territory of the Ukrainian SSR / Stupnitskaya V. et. al. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 1965. Vol. 10. P. 94-98.
- 56.Geissler E. Alibek, tularaemia, and the battle of Stalingrad. *CBW Convention Bull.* 2005. P. 10–15.
- 57.Natural tularemia foci on the territory of the Ukrainian SSR / Stupnitskaya V. et. al. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 1965. Vol. 10. P. 94-98.
- 58.Русев І. Т. Вплив антропогенної трансформації території Дунай-Дністровського межиріччя на природну вогнищевість туляремії. *Вісник Дніпропетровського університету університету.* 2011. Вип. 2, № 1. С. 103-107.

59. Titball R. W., Oyston P. C. F. *Francisella tularensis. Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases* / Edited by Alan D. T. et. al. Academic press, 2009. P. 1241-1253
60. Berdal B.P., Soderlund E. Cultivation and isolation of *Francisella tularensis* on selective chocolate agar, as used routinely for the isolation of gonococci. *Acta Pathol Microbiol Scand B*. 1977. Vol. 85B, № 1. P. 108 - 109.
61. Payne M.P., Morton R.J. Effect of culture media and incubation temperature on growth of selected strains of *Francisella tularensis*. *J Vet Diagn Invest*. 1992. Vol. 4, № 3. P. 264 - 269.
62. Oolsufjev N. G., Mescheryakova I. S. Subspecific Taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *International journal of systematic bacteriology*. 1981. Vol. 33, № 4. P. 872-874
63. Detection of *Francisella tularensis*-Specific Antibodies in Patients with Tularemia by a Novel Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / Sharma N. et. al. *Clin Vaccine Immunol*. 2013. Vol. 20, №1. P. 9–16. doi: 10.1128/CVI.00516-12
64. Agglutination and ELISA Methods in the Diagnosis of Tularemia in Different Clinical Forms and Severities of the Disease / Syrjälä H. et. al. *J Infect Dis*. 1986. Vol. 153, № 1. P. 142 - 145. doi: 10.1093/infdis/153.1.142
65. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015. Vol. 72. P. 4 - 15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012. 2015
66. Open sandwich ELISA: A novel immunoassay based on the interchain interaction of antibody variable region / Ueda H. et.al. *Nature Biotechnology*. Vol.14. P.1714–1718
67. Brucellosis: serological methods compared / Heizmann W. et. al. *J Hyg*. 1985. Vol. 95. P. 639–653.

68. Comparison of serological screening tests for brucellosis / Moyer N.P. et. al. *J Clin Microbiol.* 1987. Vol. 25, № 10. P. 1969–1972.
69. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia / Schmitt P. et. al. *Epidemiol infect.* 2005. Vol. 133, № 4. P. 759 - 766. doi: 10.1017/s0950268805003742
70. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia / Porsch-Ozcürümez M. et. al. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004. Vol. 11, № 6. P. 1008 - 1015. doi: 10.1128/CDLI.11.6.1008-1015.2004
71. Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens / Versage J. et.al. *Journal of clinical microbiology.* 2003. Vol. 41, № 12. 5492–5499. DOI: 10.1128/jcm.41.12.5492-5499.2003
72. Multi-platform comparison of ten commercial master mixes for probe-based real-time polymerase chain reaction detection of bioterrorism threat agents for surge preparedness / Buzard G. et.al. *Forensic Science International.* 2012. № 223. P. 292–297. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.10.003
73. Detection of *Francisella tularensis* by the polymerase chain reaction / Junhui Z. et.al. *J Med Microbiol.* 1996. Vol. 45, №6. P. 477 - 482.
74. Fulop M., Leslie D., Titball R. A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1996. Vol. 54, № 4. P. 364–366
75. Detection of *Francisella tularensis* in Biological Specimens Using a Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, an Immunochromatographic Handheld Assay, and a PCR / Grunow R. et.al. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 2000. Vol. 7, № 1. P. 86–90. DOI: 10.1128/cdli.7.1.86-90.2000

76. Real-time PCR for *Francisella tularensis* Types A and B / Kugeler K. J. et. al. *Emerg Infect Dis.* 2006. Vol. 121, №11. P. 1799–1801. doi: 10.3201/eid1211.060629
77. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR / Sjöstedt A. et. al. *J. Clin. Microbiol.* 1997. Vol. 35, № 5. P. 1045–1048.
78. Whitehouse C. A., Hottel H. E. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Mol Cell Probes.* 2007. Vol. 21, № 2. P. 92 - 96. doi: 10.1016/j.mcp.2006.08.003
79. Sensitive Detection of *Francisella tularensis* Directly from Whole Blood by Use of the GeneXpert System Padmapriya / Banada P. P. et. al. *J Clin Microbiol.* 2017. Vol. 55, № 1. P. 291 – 301. doi: 10.1128/JCM.01126-16
80. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing / Anda P. et. al. *Emerg Infect Dis.* 2001. Vol. 7, № 3. P. 575–582.
81. Pitcher, D., Saunders, N., Owen, R. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology.* 1989. Vol. 8. P. 151-156. doi:10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x
82. Genotyping of *Francisella tularensis* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting, and 16S rRNA Gene Sequencing / Blanco N. G. D. et. al. *J Clin Microbiol.* 2002. Vol. 40, № 8. P. 2964-2972. doi: 10.1128/jcm.40.8.2964-2972.2002
83. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia / Johansson A. et. al. *J. Clin. Microbiol.* 2000. Vol. 38, №1. P. 22-26
84. Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-Like Endosymbionts when Screening Ticks by PCR / Kugeler K. et.al. *Applied and environmental microbiology.* 2005. Vol. 71, № 11. P. 7594–7597. DOI: 10.1128/AEM.71.11.7594-7597.2005



85. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis* / Vogler A.J. et.al. *Letters in Applied Microbiology*. 2008. Vol. 48, № 1. P. 140-144. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02484.x
86. Акинина Г. Е., Дугарь Ю. Н., Попов В. Н. Статистический анализ генетических данных с использованием компьютерных программ Arlequin, Philyp, Clann, Structure. Институт растениеводства им. В. Я. Юрьева: Метод. указ. Харьков, 2014. 100 с.
87. Transstadial Transmission of *Francisella tularensis holarctica* in Mosquitoes, Sweden / Lundström J. et.al. *Emerging Infectious Diseases*. 2011. Vol. 17, № 5. P. 794–799. DOI: 10.3201/eid1705.100426
88. Аналіз біологічних ризиків поширення туляремії у природних осередках у східних регіонах України / Болотін В. І., Стегній Б. Т., Солодянкін О. С. та ін. *Ветеринарна медицина*. 2016. № 102. С. 30–33.
89. McCormick R. M. A solid-phase extraction procedure for DNA purification. *Analytical Biochemistry*. 1989. Vol. 181, № 1. P. 66 – 74. doi: 10.1016/0003-2697(89)90394-1
90. Maas S. Efficient and Rapid Procedure for Blue-White Screening of Recombinant Bacterial Clones. *BioTechniques*. 2000. Vol. 27, № 6. P. 1126 – 1128. doi: 10.2144/99276bm08
91. Steffens D. L., Sutter S.L., Roemer S.C. An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13. *BioTechniques*. 1993. Vol. 15. P. 580-582
92. Филиппова Н. А. Иксодовые клещи. Подсемейства *Ixodinae*. Фауна СССР. Паукообразные. Л: Наука, 1977. Т. 4, вып. 4. С. 396.
93. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation / Chang A. Y. et. al. *UJEMI*. 2017. Vol. 1. P. 22 – 25.

94. Towards Development of Improved Serodiagnostics for Tularemia by Use of Francisella tularensis Proteome Microarrays / Nakajima R. *J Clin Microbiol.* 2016. Vol. 54, № 7. P. 1755-1765. doi: 10.1128/JCM.02784-15
95. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis / Godfroid J. et. al. *Veterinary Research.* 2005. Vol.36, № 3. P. 313–326. doi: 10.1051/vetres:2005003
96. Brucella suis infection in domestic pigs and wild boar in Croatia / Cvetnić Z. et. al. *Rev Sci Tech.* 2009. Vol. 28, № 3. P. 1057 - 1067. doi: 10.20506/rst.28.3.1947
97. Бруцельоз у сучасних умовах / Чемич М.Д. та ін. *Інфекційні хвороби.* 2017. т.4, № 90. С. 55 – 61. Doi: 10.11603/1681-2727.2017.4.8424
98. The genetic diversity of *F. tularensis* strains, isolated in different landscape-geographical zones of Ukraine / Nechoroshych Z.M. et. al. *Proceedings of the 12th Ann. Sci. Pract. Conf. Modern problems of epidemiology, microbiology, hygiene and tuberculosis.* Lviv, 2015. P. 50-53.
99. Рева А. А. Экологическая характеристика популяций грызунов лесных биогеоценозов Приднепровья. *Biosystems diversity.* 2003. т. 11. С. 208-213
100. Activity of Natural Tularemia Foci in West Ukraine / Velychko O. et. al. *Proceedings of ISDS Annual Conference.* Atlanta, 2016. P. e91.
101. Akimov I. A., Nebogatkin I. V. Distribution of Ticks from of the genus *Dermacentor* (Acari, Ixodidae) in Ukraine. *Vestnik zoologii.* 2010. Vol. 45. P. 35-40. doi: 10.2478/v10058-011-0001-x
102. Akimov I. A., Nebogatkin I. V. Seasonal Changes in Activity, Sex Composition and Areal of the Tick *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodida) in the

Landscape-Geographical Regions of Ukraine. *Vestnik zoologii*. 2010. Vol. 44, № 3. e-19 - e-25. Doi: 10.2478/v10058-010-0014-x

103. Биоценоотические особенности природных очагов туляремии степной зоны Украины / Русев И.Т. и др. *Вісник Сумського державного університету. Серія Медицина*. 2005. Т. 79, № 7. С. 25-35.

104. Молекулярно-генетичний аналіз штамів *Francisella tularensis holarctica*, що ізольована на території України / Нехороших З. М. та ін. *World science*. 2018. т. 34, № 6. С. 14 – 17. Doi: 10.31435/rsglobal\_ws/12062018/5857

105. Ranford J.C., Henderson B. Chaperonins in disease: mechanisms, models, and treatments. *Molecular Pathology*. 2002. Vol. 55, № 4. P. 209-213. Doi: 10.1136/mp.55.4.209

106. Stress Wars: the Direct Role of Host and Bacterial Molecular Chaperones in Bacterial Infection / Henderson B. et. al. *Infection and Immunity*. 2006. Vol. 74, № 7. P. 3693-3706. Doi: 10.1128/IAI.01882-05

107. Kilmury S. L. N., Twine S. M. The *Francisella tularensis* proteome and its recognition by antibodies. *Front. Microbiol*. 2011. Vol. 1, № 143. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00143>

108. Towards Development of Improved Serodiagnostics for Tularemia by Use of *Francisella tularensis* Proteome Microarrays / Nakajima R. et. al. *J Clin Microbiol*. 2016. Vol. 54, №7. P.1755–1765. doi:10.1128/JCM.02784-15

109. Использование внешних и внутренних контрольных образцов при постановке полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции полимеразной цепной реакции / Сизикова Т. Е. и др. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013. №3. С. 41- 44. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-vneshnih-i-vnutrennih->

kontrolnyh-obraztsov-pri-postanovke-polimeraznoy-tsepnoy-reaktsii-i-obratnoy-transkriptsii (дата звернення: 24.10.2019).

110. Мультиплексна ПЛР тест-система для детекції збудника туляремії: пат. №75546 Україна: МПК 2006. C12Q 1/68 C12N 15/31 C12R 1/00 .№ 2012 04662; заявл. 13.04.2012; опубл. 10.12.2012., Бюл. №23.

111. Африканська чума свиней в Україні та прогнозування її розповсюдження / Хоменко С. та ін. *Біологія тварин*. 2016. т. 18, № 2. С. 133 – 143.

112. Airborne transmission of tularemia in farmers / Syrjälä H. et. al. *Scand J Infect Dis*. 1985. Vol. 17, № 4. P. 371-5. DOI: 10.3109/13813458509058777

113. Serological Investigation of Wild Boars (*Sus scrofa*) and Red Foxes (*Vulpes vulpes*) As Indicator Animals for Circulation of *Francisella tularensis* in Germany / Otto P. et. al. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014. Vol. 14, № 1. P. 46–51. doi: 10.1089/vbz.2013.1321

114. Alekseeva H., Petrenko O., Nevolko O. Monitoring of brucellosis in wild boars in 2013-2014 in Ukraine. *69th Brucellosis Meeting and International Conference on Brucellosis*. New Delhi, 2016. P. 184.

115. Bayesian Estimation of Sensitivity and Specificity of Rose Bengal, Complement Fixation, and Indirect ELISA Tests for the Diagnosis of Bovine Brucellosis in Ethiopia / Getachew T. et. al. *Vet Med Int*. 2006. P.8032753. doi: 10.1155/2016/8032753.

116. Evaluation of three serological tests for brucellosis in naturally infected cattle using latent class analysis / Muma J.B. et.al. *Vet Microbiol*. 2007. Vol. 1-2, № 125. P.187-92. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.05.012

117. Seroprevalence of brucellosis and its associated risk factors in cattle from small holder dairy farms in Zimbabwe / Matope G. et. al. *Trop Anim Health Prod*. 2011. Vol. 43, № 5. P. 975–982. doi: 10.1007/s11250-011-9794-4.

118. Zakaria A. M., Ahmed S.F., Motawae M.S. Seropositivity in animals and risk of occupational brucellosis among abattoirs personnel associated with poor work practices and absence of safety policy in Egypt. *Int J Occup Environ Health*. 2018. Vol. 1-2, № 24. P. 55-60. doi: 10.1080/10773525.2018.1516839.
119. Stress Wars: the Direct Role of Host and Bacterial Molecular Chaperones in Bacterial Infection / Henderson B. et. al. *Infection and Immunity*. 2006. Vol. 74, № 7. P. 3693-3706. Doi: 10.1128/IAI.01882-05
120. Hubálek Z., Rudolf I. *Francisella tularensis* prevalence and load in *Dermacentor reticulatus* ticks in an endemic area in Central Europe. *Med Vet Entomol*. 2007. Vol. 2. P. 234-239. Doi:10.1111/mve.12229
121. Frequent isolation of *Francisella tularensis* from *Dermacentor reticulatus* ticks in an enzootic focus of tularemia / Hubálek Z. et. al. *Med Vet Entomol*. 1996. Vol. 10, № 3. P. 241-246.
122. Occurrence of *Francisella* spp. in *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland / Wójcik-Fatla A. et. al. *Tick Borne Dis*. 2015. Vol. 6., № 3. P. 253-257. Doi:10.1016/j.ttbdis.2015.01.005
123. Environmental Monitoring and Surveillance of Rodents and Vectors for *Francisella tularensis* Following Outbreaks of Human Tularemia in Georgia / Elashvili E. et. al. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2015. Vol. 15, № 10. P. 633–636, doi: 10.1089/vbz.2015.1781
124. Literature Review on Processing and Analytical Methods for *Francisella tularensis* in Soil and Water / Chief editor Silvestri E. Cincinnati: United States Environmental Protection Agency, 2015. 53 p.
125. Development of recombinant antigen-based ELISA for the detection of anti-tularemia antibodies in swine and human sera: a pilot study / Zlenko O. B., Popp C., von Buttlar H., Gerilovych A. P., Schwarz J. *Biotechnologia Acta*. 2020. Vol. 13, No 1. P. 45-55

126. Zlenko O.B., Gerilovych A.P. Development of recombinant positive control for *Francisella tularensis* detection by qPCR / *Biotechnologia Acta*. 2018. Vol. 11, No 4. P. 68-72.
127. PCR based prevalence study of *Francisella tularensis* in Kharkiv, Dnipropetrovsk, and Mykolaiv oblasts during 2015–2018 / Zlenko O. B., Tkach G. E., Sukhorukova A.B., Kylypko L.V., Machota L. S., Ignatenkov O. S., Vinokurova K. V., Shamychkova G. R., Shtepa O. P., Rezykh V. G., Schwarz J., Duerr A., Popp C., von Buttlar H., Wolfel R., Solodiankin O.S., Gerilovych A. P. *J Vet Res*. 2020. Vol. 64, No 1. P. 63-71
128. Genotyping of *Francisella tularensis* isolates from Ukraine / Zlenko O. B., Durr A., Schwarz J., Vydaiko N. B., Gerilovych A. P. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2018. Vol. 4, No 4. P. 12-15
129. Serosurveillance for *Francisella tularensis* Among Wild Animals in Japan Using a Newly Developed Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / Sharma N et. al. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014. Vol. 14, №4. P. 234–239.
130. Case report on the human infection with tularemia in Mykolaiv region, 2018 / Zlenko O.B., Ignatenkov O.S., Vinokurova K.V., Gerilovych A.P. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2020. Vol. 6, No 1. P. 15-17

## ДОДАТКИ

## Додаток А

Свідоцтво про патент на корисну модель «Спосіб отримання рекомбінантних антигенів GroE1FTT, FTT0975, SucBFTT для діагностики туляремії за допомогою ІФА»



## Додаток Б

Свідоцтво про патент на корисну модель «Рекомбінантний контрольний зразок для виявлення ДНК збудника туляремії методом полімеразної ланцюгової реакції pTZ57R/T\_FTFP»





## Додаток В

Свідоцтво про патент на корисну модель «Тест-система для виявлення ДНК збудника туляремії за допомогою полімеразної ланцюгової реакції

“Tul-DNA-test”»



## Додаток Д

Результати оптичної щільності серійних розведень протеїну FTT0975 та титрування досліджуваних сироваток при проведенні ІФА (n=3; CV <10%)

FTT0975 1:25 CV <10%					FTT0975 1:50				
Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині	Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині
1:50	1,266±0,002	0,41±0,002	2,421±0,005	0,873±0,003	1:50	1,301±0,001	0,425±0,003	2,35±0,004	0,723±0,005
1:100	0,925±0,009	0,257±0,001	1,987±0,001	0,443±0,005	1:100	0,831±0,001	0,268±0,006	1,764±0,003	0,382±0,004
1:200	0,715±0,003	0,19±0,001	1,865±0,004	0,367±0,006	1:200	0,616±0,002	0,164±0,005	1,721±0,001	0,252±0,002
1:400	0,48±0,007	0,103±0,008	1,454±0,004	0,174±0,002	1:400	0,406±0,004	0,099±0,009	1,167±0,009	0,147±0,002
FTT0975 1:100					FTT0975 1:200				
Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині	Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині
1:50	1,147±0,003	0,491±0,008	2,282±0,003	0,637±0,017	1:50	1,07±0,009	0,507±0,004	2,076±0,017	0,603±0,002
1:100	0,723±0,006	0,239±0,005	1,155±0,013	0,303±0,002	1:100	0,548±0,018	0,232±0,003	0,876±0,001	0,285±0,002
1:200	0,559±0,04	0,173±0,003	1,56±0,017	0,202±0,011	1:200	0,49±0,005	0,188±0,007	1,116±0,012	0,207±0,007
1:400	0,382±0,007	0,116±0,002	0,997±0,002	0,093±0,002	1:400	0,339±0,04	0,101±0,019	0,698±0,012	0,101±0,018
FTT0975 1:400					FTT0975 1:800				
Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині	Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині
1:50	0,915±0,012	0,569±0,001	1,578±0,018	0,522±0,011	1:50	0,748±0,018	0,582±0,006	1,356±0,001	0,409±0,001
1:100	0,462±0,014	0,226±0,007	0,676±0,007	0,253±0,018	1:100	0,433±0,02	0,3±0,017	0,786±0,002	0,223±0,006
1:200	0,403±0,005	0,149±0,018	0,796±0,017	0,214±0,003	1:200	0,292±0,011	0,158±0,015	0,555±0,009	0,15±0,018
1:400	0,277±0,013	0,085±0,007	0,357±0,007	0,193±0,008	1:400	0,213±0,006	0,107±0,008	0,333±0,022	0,104±0,013

## Додаток Ж

Результати оптичної щільності серійних розведень протеїну SucBFTT та титрування досліджуваних сироваток при проведенні ІФА (n=3; CV <10%)

SucBFTT 1:25					SucBFTT 1:50				
Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині	Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині
1:50	1,517±0,012	0,41±0,003	2,006±0,009	0,873±0,005	1:50	1,474±0,006	0,333±0,012	1,861±0,008	0,426±0,021
1:100	0,925±0,009	0,257±0,009	1,987±0,015	0,443±0,002	1:100	1,141±0,006	0,162±0,002	1,125±0,003	0,18±0,012
1:200	0,715±0,013	0,19±0,017	1,065±0,003	0,367±0,002	1:200	0,891±0,008	0,092±0,007	0,698±0,001	0,131±0,004
1:400	0,48±0,022	0,103±0,015	0,654±0,007	0,174±0,008	1:400	0,728±0,012	0,051±0,028	0,399±0,002	0,082±0,005
SucBFTT 1:100					SucBFTT 1:200				
Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині	Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині
1:50	1,417±0,001	0,35±0,005	1,404±0,008	0,338±0,005	1:50	1,373±0,004	0,382±0,003	1,006±0,009	0,385±0,043
1:100	1,102±0,016	0,187±0,012	1,025±0,006	0,18±0,003	1:100	1,085±0,002	0,211±0,009	0,876±0,009	0,176±0,032
1:200	0,89±0,009	0,102±0,009	0,682±0,007	0,131±0,004	1:200	0,91±0,001	0,114±0,003	0,533±0,013	0,128±0,002
1:400	0,706±0,002	0,06±0,016	0,339±0,003	0,097±0,011	1:400	0,702±0,003	0,066±0,019	0,331±0,018	0,092±0,041
SucBFTT 1:400					SucBFTT 1:800				
Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині	Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині
1:50	1,253±0,022	0,447±0,007	0,915±0,018	0,506±0,04	1:50	1,158±0,007	0,513±0,008	0,756±0,003	0,492±0,005
1:100	1,031±0,003	0,249±0,001	0,462±0,012	0,22±0,007	1:100	0,947±0,005	0,274±0,002	1,246±0,007	0,216±0,003
1:200	0,922±0,022	0,127±0,009	0,403±0,013	0,129±0,003	1:200	0,703±0,013	0,154±0,008	0,21±0,013	0,122±0,004
1:400	0,697±0,002	0,077±0,006	0,277±0,012	0,089±0,021	1:400	0,629±0,003	0,082±0,025	0,2±0,032	0,085±0,004

## Додаток 3

Результати оптичної щільності серійних розведень протеїну GroEIFTT та титрування досліджуваних сироваток при проведенні ІФА (n=3; Intra CV <10%)

GroEIFTT 1:25					GroEIFTT 1:50				
Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині	Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині
1:50	2,535±0,005	0,169±0,004	1,784±0,006	0,662±0,013	1:50	2,453±0,012	0,252±0,008	1,312±0,011	0,567±0,003
1:100	2,403±0,005	0,158±0,006	1,468±0,005	0,458±0,002	1:100	2,22±0,018	0,141±0,002	1,304±0,008	0,407±0,008
1:200	2,254±0,005	0,085±0,013	1,003±0,005	0,208±0,019	1:200	2,06±0,018	0,062±0,006	0,924±0,009	0,178±0,008
1:400	2,061±0,004	0,086±0,005	0,561±0,001	0,14±0,012	1:400	1,807±0,004	0,05±0,004	0,568±0,013	0,097±0,001
GroEIFTT 1:100					GroEIFTT 1:200				
Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині	Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині
1:50	2,254±0,008	0,257±0,006	1,616±0,005	0,635±0,003	1:50	2,041±0,004	0,334±0,001	1,343±0,022	0,6±0,016
1:100	2,164±0,009	0,194±0,001	1,373±0,001	0,386±0,017	1:100	1,994±0,002	0,139±0,005	0,995±0,009	0,337±0,003
1:200	1,955±0,007	0,093±0,008	0,85±0,017	0,189±0,003	1:200	1,74±0,008	0,07±0,018	0,64±0,014	0,145±0,003
1:400	1,6±0,006	0,151±0,003	0,484±0,001	0,093±0,005	1:400	1,331±0,001	0,068±0,021	0,291±0,001	0,089±0,013
GroEIFTT 1:400					GroEIFTT 1:800				
Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині	Розведення сироваток	Позитивна сироватка від людини	Негативна сироватка від людини	Позитивна сироватка від свині	Негативна сироватка від свині
1:50	1,965±0,017	0,23±0,004	0,889±0,001	0,565±0,007	1:50	1,576±0,008	0,422±0,002	0,774±0,002	0,513±0,001
1:100	1,761±0,004	0,154±0,006	0,879±0,002	0,285±0,008	1:100	1,685±0,026	0,19±0,003	0,7±0,001	0,279±0,012
1:200	1,445±0,007	0,088±0,015	0,5±0,006	0,142±0,008	1:200	1,131±0,017	0,093±0,01	0,336±0,002	0,146±0,007
1:400	0,878±0,018	0,104±0,041	0,235±0,015	0,076±0,024	1:400	0,651±0,024	0,056±0,009	0,172±0,009	0,066±0,018

## Додаток И

Результати випробовувань протеїнів GroEl, SucB і FTT0975 із панеллю сироваток, позитивних щодо антитіл проти *F.tularensis* subsp. *holarctica*, *F.tularensis* subsp. *novicida*, *F.tularensis* subsp. *philomiragia* і *Brucella* spp (n=4; CV <10%)

День 1	SucB		FTT0975		GroEL	
	Середнє значення	CV Intra, %	Середнє значення	CV Intra, %	Середнє значення	CV Intra, %
<i>F.tul.</i> subsp. <i>holarctica</i>	1,147±0,007	0,605	1,066±0,009	0,800	1,832±0,067	3,36
<i>F.tul.</i> subsp. <i>philomiragia</i>	1,092±0,02	2,153	0,37±0,011	2,879	1,302±0,048	3,652
<i>F.tul.</i> subsp. <i>novicida</i>	1,028±0,003	0,252	0,68±0,02	2,953	0,790±0,03	3,785
<i>Brucella</i> spp.	0,514±0,007	1,406	0,674±0,015	2,218	0,539±0,004	0,824
Негативна сироватка	0,301±0,005	1,644	0,382±0,007	1,906	0,380±0,006	1,604

День 2	SucB		FTT0975		GroEL	
	Середнє значення	CV Intra, %	Середнє значення	CV Intra, %	Середнє значення	CV Intra, %
<i>F.tul.</i> subsp. <i>holarctica</i>	1,463±0,031	2,148	1,448±0,026	1,785	1,992±0,021	1,054
<i>F.tul.</i> subsp. <i>philomiragia</i>	1,167±0,025	2,152	0,537±0,012	2,184	1,262±0,03	2,413
<i>F.tul.</i> subsp. <i>novicida</i>	1,220±0,044	3,622	0,691±0,015	2,235	0,58±0,015	2,537
<i>Brucella</i> spp.	0,437±0,006	1,277	0,701±0,009	1,223	0,603±0,006	0,956
Негативна сироватка	0,292±0,011	3,777	0,474±0,007	1,525	0,402±0,007	1,843

День 3	SucB		FTT0975		GroEL	
	Середнє значення	CV Intra, %	Середнє значення	CV Intra, %	Середнє значення	CV Intra, %
<i>F.tul.</i> subsp. <i>holarctica</i>	1,578±0,014	0,886	1,280±0,005	0,352	2,02±0,011	0,532
<i>F.tul.</i> subsp. <i>philomiragia</i>	1,499±0,011	0,742	0,426±0,005	1,264	1,548±0,03	1,947
<i>F.tul.</i> subsp. <i>novicida</i>	1,295±0,029	2,253	0,695±0,011	1,596	0,710±0,005	0,665
<i>Brucella</i> spp.	0,506±0,004	0,877	0,864±0,023	2,699	0,722±0,007	1,032
Негативна сироватка	0,316±0,008	2,400	0,406±0,006	1,464	0,418±0,007	1,638

