

ОСОБЕННОСТИ β -ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СРЕДНЕАЗИАТСКОГО ПОДВИДА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

И.В. Бахтеева, Т.Б. Кравченко, А.К. Рябко, Г.М. Титарева, И.О. Лев, А.Н. Мокриевич, В.С. Тимофеев

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия

Резюме. Возбудителем туляремии является мелкая грамотрицательная бактерия *Francisella tularensis*. Этот вид делится на четыре подвида: ssp. *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*, которые различаются по географическому ареалу распространения, вирулентности и эпидемиологическому потенциалу. До недавнего времени на территории РФ выявлялся только подвид *holarctica*. Однако в 2013 г. на Алтае был обнаружен природный очаг туляремии, в котором циркулируют штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, выделяемые ранее только в Средней Азии. Данные лабораторных исследований свидетельствуют о способности штаммов этого подвида вызвать инфекцию у кроликов и мышей, сравнимую по тяжести с инфекцией, вызываемой штаммами голарктического подвида. Однако вирулентность и эпидемическая опасность среднеазиатского подвида *F. tularensis* для человека до сих пор остается неопределенной, так как случаев туляремии у человека, вызванных штаммами этого подвида, не было зарегистрировано, что может быть связано с особенностями его географического распространения — и Средняя Азия, и Горный Алтай являются крайне редконаселенными регионами. Основным фенотипическим признаком этого подвида является отсутствие активности фермента β -лактамазы, отвечающего за природную устойчивость к β -лактамам антибиотикам (пеницилинам, цефалоспорином и карбапенемам). При этом, несмотря на отсутствие детектируемой ферментативной активности, штаммы среднеазиатского подвида сохраняют устойчивость к этим антибиотикам. В настоящей статье мы приводим данные о том, что штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, вопреки общепринятым представлениям, обладают β -лактамазной активностью, но при этом скорость гидролиза β -лактамов значительно снижена по сравнению со штаммами подвида *holarctica*. Кроме того, при снижении количества микробных клеток в питательной среде начинает проявляться и антибиотикочувствительность. Мы выявили единственную подвидоспецифичную для subsp. *mediasiatica* нуклеотидную замену G/A в 290 положении гена *blaB*, кодирующего активную сериновую β -лактамазу. Эта замена приводит к аминокислотной замене Gly на Arg в 97 положении белка BlaB. Мы полагаем, что данная замена является наиболее вероятной причиной снижения активности этого фермента, обуславливая возможные конформационные изменения, приводящие либо к снижению сродства фермента к субстрату, либо к увеличению времени существования фермент-субстратного комплекса. Выявленная замена послужила основой для разработки аллель-специфичного ПЦР-теста, позволяющего определить принадлежность исследуемого штамма *F. tularensis* к подвиду *mediasiatica*.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, среднеазиатский подвид, β -лактамазная активность, антибиотикоустойчивость, гены β -лактамаз, генетическое разнообразие.

Адрес для переписки:

Бахтеева Ирина Викторовна
142279, Россия, Московская область, Серпуховский район,
п. Оболensk, ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии
и биотехнологии.
Тел.: 8 (926) 478-37-54.
E-mail: bahteeva@obolensk.org

Contacts:

Bakhteeva V. Irina
142279, Russian Federation, Moscow region, Serpukhov district,
Obolensk, State Research Center for Applied Microbiology and
Biotechnology.
Phone: +7 (926) 478-37-54.
E-mail: bahteeva@obolensk.org

Библиографическое описание:

Бахтеева И.В., Кравченко Т.Б., Рябко А.К., Титарева Г.М., Лев И.О., Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С. Особенности β -лактамазной активности среднеазиатского подвида туляремиийного микроба // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 33–42. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-33-42

Citation:

Bakhteeva I.V., Kravchenko T.B., Ryabko A.K., Titareva G.M., Lev I.O., Mokrievich A.N., Timofeev V.S. Features of beta-lactamase activity in *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 33–42. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-33-42

FEATURES OF BETA-LACTAMASE ACTIVITY IN *FRANCISELLA TULARENSIS* subsp. *MEDIASIATICA*

Bakhteeva I.V., Kravchenko T.B., Ryabko A.K., Titareva G.M., Lev I.O., Mokrievich A.N., Timofeev V.S.

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

Abstract. Small Gram-negative bacteria *Francisella tularensis* is the tularemia causative agent. This species subdivides on four subspecies — ssp. *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* and *novicida*, which have some differences in their distribution areas, pathogenicity and epidemical potential. Until recently only subspecies *holarctica* was found on the territory of the Russian Federation, but in 2013 a natural focus of tularemia in which circulates *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* was found on the Altai. Till now this subspecies was found only in Central Asia. The data of laboratory studies indicate the ability of strains of this subspecies to cause infection in rabbits and mice which is comparable in severity to infection caused by subsp. *holarctica* strains. However, the virulence of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* for humans and its epidemical potential are still unclear, since no cases of human infection caused by the strains of this subspecies have been recorded, probably due to the geographical aspects — mountainous Altai and Central Asia are extremely sparsely populated regions. The main phenotypic feature of this subspecies is the lack of activity of β -lactamase, which is responsible for the natural resistance to β -lactam antibiotics (penicillins, cephalosporins and carbapenems). Despite the absence of detectable enzymatic activity, subsp. *mediasiatica* strains are resistant to these antibiotics. In this article we report that subsp. *mediasiatica* strains have β -lactamase activity despite to current opinion, but the of β -lactams hydrolysis rate is much more lower in comparison with reaction rate of subs. *holarctica* strains. In addition, in case of a decrease of the microbial cells number in the nutrient medium, antibiotic susceptibility appears. We identified a single specific for subsp. *mediasiatica* nucleotide substitution G/A at the 290 position of the *blaB* gene, which encodes the active serine β -lactamase. This substitution leads to the amino acid substitution Gly/Arg at the 97 position of the protein BlaB. We assume, that enzymatic activity decreasing is the most likely caused by this substitution), for example it may cause some conformational changes leading either to enzyme — substrate affinity decreasing or to in the lifetime of the enzyme-substrate complex increasing. On the basis of the found nucleotide substitution, we developed an allele-specific PCR test that makes it possible to determine whether the studied strain *F. tularensis* belongs to the subspecies *mediasiatica*.

Key words: *Francisella tularensis*, subspecies *mediasiatica*, β -lactamase activity, antibiotic resistance, genes of β -lactamase, genetic diversity.

Введение

Возбудитель туляремии, *Francisella tularensis*, имеет внутривидовое разделение на 4 подвида, различающихся ареалами распространения, степенью патогенности и эпидемической значимостью [11], поэтому подвидовая идентификация культур *F. tularensis* является важным этапом диагностики туляремийной инфекции, обеспечивая предварительную оценку вирулентности и эпидемиологической опасности. До недавнего времени на территории РФ выявлялся в основном подвид *holarctica*, однако в 2013 г. на Алтае был обнаружен природный очаг туляремии, в котором циркулируют штаммы *F. tularensis*, относящиеся к среднеазиатскому подвиду (*mediasiatica*) [2]. Вирулентность и эпидемическая опасность среднеазиатского подвида *F. tularensis* для человека до сих пор остается terra incognita, так как случаев туляремии у человека, вызванных штаммами этого подвида, не было зарегистрировано. Вполне вероятно, что это связано с ареалом его распространения — в малонаселенных районах Средней Азии с низкоэффективным медицинским обслуживанием. Немногочисленные опубликованные данные лабораторных исследований свидетельствуют о его способности вызвать инфекцию у кроликов и мышей [18]. Эксперименты, проводимые в нашей лаборатории (данные не опубликованы), свидетельствуют о том, что его вирулентность для мышей сходна с вирулентностью подвида *holarctica*. Основным диагностическим признаком *F. tularensis* subsp.

mediasiatica является отсутствие β -лактамазной активности, отвечающей за природную устойчивость туляремийного микроба к антибиотикам β -лактаманного ряда [4, 5].

Для туляремийного микроба характерна природная резистентность к β -лактамам [3, 6], и в ряде работ были охарактеризованы гены β -лактамаз *F. tularensis*, а также показано, что лишь один из этих генов *blaB* кодирует функционально активный белок FTU-1, обеспечивающий резистентность к ампициллину [7, 8, 14]. Аналоги FTU-1 были обнаружены у всех четырех подвигов туляремийного микроба, включая *F. tularensis* подвида *mediasiatica*. β -лактамазная активность регистрируется как в тесте чувствительности к антибиотикам, так и в колориметрическом тесте с хромогенным субстратом нитроцефином [15, 17]. В работе М.В. Цимбалистовой и Н.В. Павлович штаммы *F. tularensis* разных подвигов демонстрировали в диско-диффузионном тесте высокую резистентность к антибиотикам группы пенициллинов вне зависимости от подвиговой принадлежности и β -лактамазной активности в тесте с нитроцефином [5]. Таким образом, по данным литературы [4, 5], у штаммов туляремийного микроба среднеазиатского подвида, обладающих резистентностью к пенициллинам и имеющих в своем геноме ген активной сериновой лактамазы FTU-1, не выявляется β -лактамазная активность, определяемая в колориметрическом тесте.

Наличие функционально активной β -лактамазы согласуется с устойчивостью штаммов

среднеазиатского подвида к пенициллинам, но вступает в противоречие с отсутствием β-лактамазной активности. Поиск причин этого противоречия послужил основанием для выполнения данного исследования. В данной работе мы приводим результаты сравнительного изучения кинетических характеристик β-лактамазной активности штаммов *F. tularensis* разных подвидов и вариабельности генетических детерминант, обуславливающих β-лактамазную активность *F. tularensis*. Частично результаты данной работы были доложены на II Национальном конгрессе бактериологов «Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях» (20–22 сентября 2016 г., Санкт-Петербург).

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов, среды и условия культивирования. В работе использовали 29 природных штаммов *F. tularensis* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (26 — подвида *mediasiatica*, 2 — подвида *holarctica* и один штамм — подвида *tularensis*). Кроме того, в ряде экспериментов использовали полученные с помощью гомологичной рекомбинации варианты штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ ssp. *holarctica* с инактивированными β-лактамазами (для получения штамма 15Δ123, чувствительного к β-лактамам) и штамма 120 ssp. *mediasiatica* с инактивированным геном *pur* (для получения аттенуированного штамма 120Δ*pur*). Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37°C на плотной питательной среде FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ) и в жидкой питательной среде [2] с добавлением полимиксина В до концентрации 100 мг/л.

Анализ *in silico*. Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием баз данных, доступных на информационном портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Множественное выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов, расчет их температур плавления, трансляция *in silico*, анализ расположения на хромосоме исследуемых генов и их гомологов, а также их фрагментов проводились с помощью пакета программ Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation).

Выделение нуклеиновых кислот из бактерий проводили с помощью набора реагентов Gen-Elute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкциям производителя.

Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы биотехнологической компанией «Синтол» (Москва, Россия).

Алель-специфическая ПЦР (AS-ПЦР). Анализ нуклеотидной замены в гене *blaV* осуществляли

с помощью AS-ПЦР по схеме, предложенной Birdsell [9]. Учет результатов AS-ПЦР проводили в реальном времени по анализу кривых плавления в амплификаторе с оптическим ПЦР-модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc, США) с использованием «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-PB в присутствии красителя SYBR Green I» (Синтол, Россия, Москва). Интенсивность SYBR Green-флуоресценции измеряли при длине волны 530 нм. Детекцию продуктов амплификации проводили с использованием оптического ПЦР-модуля по каналу FAM/SYBR.

Определение устойчивости к антибиотикам диско-диффузионным методом. Из суточной агаровой культуры *F. tularensis* готовили миллиардную микробную взвесь в забуференном физиологическом растворе с использованием стандарта мутности ОСО. На поверхность чашек с подсушенным FT-агаром наносили 1 мл взвеси, посредством покачивания чашки культуру равномерно распределяли по поверхности среды, подсушивали и затем на поверхность среды накладывали стандартные диски с антибиотиками (OXOID, Великобритания). Через 24 ч измеряли диаметр зоны торможения роста бактериальной культуры вокруг соответствующих дисков с антибиотиками (включая диаметр диска).

Определение устойчивости к антибиотикам методом серийных разведений. В 96-луночных планшетах готовили двукратные разведения антибиотиков в жидкой питательной среде для туляремиального микроба [1] в объеме 100 мкл. Бактериальные суспензии использовали в конечных концентрациях от 2×10^3 до 2×10^8 м.к./мл, антибиотики от 0,05 до 10 000 мг/л.

Бактерицидный эффект антибиотика определяли через 48 ч с помощью колориметрического теста МТТ [12]. Для этого во все лунки 96-луночного планшета добавляли по 10 мкл раствора МТТ в забуференном физиологическом растворе (5 мг/мл) и дополнительно инкубировали в течение 4–6 ч при температуре 37°C, затем содержимое лунок растворяли добавлением 50 мкл 10%-ного раствора додецилсульфата натрия, приготовленного на 0,01 М соляной кислоте, и измеряли оптическую плотность полученного лизата при длине волны 595 с использованием спектрофотометра Ultrospec 3100 pro (Pharmacia, США). Бактерицидный эффект учитывали либо по минимальной бактерицидной концентрации (по лункам со 100% гибелью микроорганизмов), либо по проценту живых клеток по формуле $OD_{595_{аб}}/OD_{595_{контроль}} \times 100$.

Истощение пула пенициллина в жидкой питательной среде в присутствии бактериальных клеток *F. tularensis*. В жидкую питательную среду, содержащую 400 мкг/мл пенициллина, вносили бактериальные суспензии сравниваемых штаммов *F. tularensis* и культивировали в течение 24 ч. Остаточное количество антибиотика в супер-

натанте измеряли через 4 и 24 ч по способности супернатанта ингибировать рост контрольного чувствительного к пенициллину штамма *F. tularensis* 15 Δ123 с инактивированными β-лактамазами. В качестве контроля антибиотика использовали двукратные разведения пенициллина в питательной среде, начиная с 400 мкг/мл. Определяли титр супернатанта, при котором рост чувствительного штамма не ингибировался, и по нему рассчитывали остаточное количество антибиотика в супернатанте

Подготовка проб для определения бета-лактамазной активности. Суспензии *F. tularensis* подвергали деструкции обработкой ультразвуком с помощью ультразвукового дезинтегратора (Cole-Parmer, США) при мощности 150 Вт дробно в течение 60 с. Полученные пробы осветляли центрифугированием при 13 000 об./мин и супернатанты ультразвуковых лизатов (УЗЛ) использовали для дальнейшей работы.

Кинетические параметры β-лактамазной активности культур *F. tularensis* определяли на спектрофотометре Multiskan Ascent 96/384 Plate Reader (LabSystems, США), в качестве субстрата использовали хромогенный цефалоспирин нитроцефин с концентрацией 500 мкг/мл, гидролиз которого приводит к образованию окрашенного продукта, количество которого прямо пропорционально уровню β-лактамазной активности. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 495 нм при температуре 37°C после добавления нитроцефина в течение первого часа — каждые 15 мин, далее — каждый час в течение суток. Измерение удельной активности фермента и скорости ферментативной реакции проводили с использованием спектрофотометра Ultrospec 3100 pro (Pharmacia, США) и термостатируемой спектрофотометрической ячейки (Biochrom, США) как описано [10].

Результаты

Чувствительность *F. tularensis* разных подвидов к антибиотикам группы бета-лактамов

Известно, что штаммы туляремийного микроба среднеазиатского подвида, в отличие от subsp. *tularensis* и *holarctica*, не обладают пенициллазной активностью, определяемой в тесте с феноловым красным или нитроцефином [4, 5], хотя и имеют в своем геноме ген сериновой лактамазы FTU-1, ответственной за устойчивость к пенициллинам [7]. Используя диско-диффузионный метод, мы определили чувствительность к β-лактамам антибиотикам у 12 штаммов *F. tularensis* различных подвидов из коллекции ГНЦ ПМБ. Результаты экспериментов приведены в таблице 1.

Из данных таблицы видно, что штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* ничем не отличались от штаммов других подвидов по уровню рези-

стентности к β-лактамам. Полученные результаты соотносятся с данными М.В. Цимбалистовой и Н.В. Павлович [5], согласно которым штаммы *F. tularensis* среднеазиатского подвида резистентны к β-лактамам антибиотикам в диско-диффузионном тесте.

Однако использование метода стандартных разведений позволило выяснить, что устойчивость к ампициллину у штамма среднеазиатского подвида *F. tularensis* 120Δpur значительно различается в зависимости от его концентрации: когда концентрация микробной взвеси снижалась до 10⁶ м.к./мл, штамм *F. tularensis* 120Δpur демонстрировал значительное повышение чувствительности к ампициллину по сравнению с референсным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ. Используя десятикратные разведения микробной суспензии в присутствии антибиотика, мы определили минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) ампициллина для разных концентраций бактериальных клеток *F. tularensis* 120Δpur (табл. 2).

Для штамма 15 голарктического подвида МБК ампициллина составляла 2048 мкг/мл и не менялась при снижении концентрации до 10⁵ м.к./мл. Для штамма 120Δpur МБК ампициллина при снижении концентрации бактериальных клеток до 10⁶ м.к./мл снизилась в 256 раз.

В последующих экспериментах мы установили, что штамм 120Δpur при концентрации микробных клеток ниже 10⁶ м.к./мл приобретает чувствительность к антибиотикам группы пенициллинов, но не других групп β-лактамов (цефалоспоринов и карбопенемов) (табл. 3).

Истощение пула пенициллина в жидкой питательной среде в присутствии бактериальных клеток штамма 15 НИИЭГ голарктического подвида и штамма 120Δpur среднеазиатского подвида

Для сравнения способности бактериальных клеток *F. tularensis* разных подвидов к гидролизу пенициллина были поставлены эксперименты по истощению пенициллина в жидкой питательной среде в результате культивирования в ней клеток *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *mediasiatica* (табл. 4).

Четырехчасовое культивирование штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в среде с пенициллином в течение 4 ч снижало концентрацию антибиотика в 250 раз, штамм 120Δpur — в 2 раза. Однако последующее 24-часовое культивирование штамма 120Δpur subsp. *mediasiatica* приводило к снижению концентрации антибиотика в 125 раз (табл. 4). Таким образом, бактериальные клетки *F. tularensis* 120 Δpur в течение суток утилизировали примерно столько же пенициллина, сколько клетки *F. tularensis* 15 НИИЭГ subsp. *holarctica* гидролизировали за 4 ч культивирования.

Таблица 1. Чувствительность штаммов *F. tularensis* разных подвигов к антибиотикам группы бета-лактамов*Table 1. Susceptibility of *F. tularensis* subspecies to antibiotics of the beta-lactam group*

| Подвид Subspecies | Штаммы Strains | Пенициллины Penicillins | | Карбапенемы Carbapenems | | | Цефалоспорины Cephalosporins | | | | | | |
|----------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------|------------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------|-------------------------|
| | | Ампициллин Ampicillin | Амоксициллин Amoxicillin | Меропенем Meropenem | Имипенем Imipenem | Эртапенем Ertapenem | Цефтазидим Ceftazidime | Цефотаксим Cefotaxime | Цефуроксим Cefuroxime | Цефазолин Cephazolin | Цефтриаксон Ceftriaxone | Цефепим Cefepime | Цефокситин Cefoxitin |
| <i>tularensis</i> | Schu | 0** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 | 0 |
| <i>holarctica</i> | 503 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | A-79 | 0 | 0 | 0 | 38 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | X-3 | 0 | 0 | 11 | 26 | 28 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 |
| | A-1045 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>mediasiatica</i> | A-823 | 13 | 0 | 0 | 24 | 25 | 0 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 |
| | A-554 | 0 | 0 | 0 | 18 | 11 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 |
| | 678 | 0 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 | 0 | 0 | 0 |
| | 120 | 0 | 0 | 0 | 18 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 120Δpur | 0 | 11 | 0 | 25 | 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 13 |

Примечания. *Диаметр (мм) зоны ингибирования микробного роста *F. tularensis* в диско-диффузионном тесте (включая диаметр диска — 6 мм). **Значение 0 мм обозначает отсутствие зоны ингибирования роста микроорганизма вокруг диска.

Notes. *The growth inhibition zone (mm) in the disc-diffusion test (including the diameter of the disc — 6 mm). **The value of 0 mm indicates that there is no zone of inhibition of microorganism growth around the disk.

Динамика β-лактамазной активности штаммов *F. tularensis* 120Δpur subsp. mediasiatica и 15 НИИЭГ subsp. holarctica

Динамику β-лактамазной активности двух исследуемых штаммов *F. tularensis* — 120Δpur subsp. mediasiatica и 15 НИИЭГ subsp. holarctica — определяли в течение суток в нитроцефиновом тесте. Динамику оценивали как в живых микробных культурах *F. tularensis*, так и в соответствующих осветленных ультразвуковых лизатах (УЗЛ). В качестве отрицательного контроля использовали безлактамазный вариант штамма 15 НИИЭГ — 15Δbla123.

В качестве одной из кинетических характеристик β-лактамазной активности использовали оптическую плотность (OD) раствора, как показатель общего количества продукта гидролиза нитроцефина (рис. 1).

Как видно из рис. 1, β-лактамазная активность регистрировалась как у штамма голарктического подвида 15 НИИЭГ, так и, в меньшей степени, у штамма среднеазиатского подвида 120Δpur. При этом характер кривых накопления продукта расщепления нитроцефина двух сравниваемых штаммов различен. В пробах, содержащих *F. tularensis* голарктического подвида, отмечается выраженный пик накопления продукта расщепления нитроцефина через 4–6 ч культивирования, в то время как для штамма среднеазиатского подвида характерно медленное нарастание количества продукта гидролиза нитроцефина в течение всего периода наблюдения (24 ч).

В качестве косвенного показателя скорости расщепления нитроцефина мы в течение суток определяли скорость изменения оптической плотности реакционной смеси в единицу времени (ΔOD) (рис. 2).

Из диаграммы на рисунке 2 видно, что основная часть нитроцефина расщепляется клетками *F. tularensis* 15 НИИЭГ подвида *holarctica* в течение первого часа реакции. В осветленных лизатах изменение оптической плотности реакционной смеси в первый час реакции достигало

Таблица 2. Чувствительность штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 120Δpur к ампициллинуTable 2. The susceptibility of *F. tularensis* 15 NIEG and 120Δpur strains to ampicillin

| Концентрация бактериальных клеток/мл Bacterial cells concentration per ml | МБК, мкг/мл (диапазон)* MBC, μg/ml (range)* | |
|--|--|---------|
| | 15 НИИЭГ 15 NIEG | 120Δpur |
| 10 ⁸ | > 2048 | > 2048 |
| 10 ⁷ | > 2048 | > 2048 |
| 10 ⁶ | > 2048 | 8 |
| 10 ⁵ | 256–1024 | 2 |
| 10 ⁴ | 32 | 0,125 |
| 10 ³ | 2 | 0,125 |

Примечание. *Представлены значения МБК в двух независимых экспериментах, каждая проба в каждом эксперименте была поставлена в трех повторах.

Note. *There indicated results of MBC measurement in two independent experiments, in each of which each sample was placed in three replicates.

Таблица 3. Чувствительность штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 120Δpur к β-лактамам*
Table 3. The susceptibility of *F. tularensis* 15 NIEG and 120Δpur to β-lactams*

| Антибиотик Antibiotic | МБК, мг/л (диапазон)** MBC, mg/L (range) | |
|--------------------------|---|---------|
| | 15 НИИЭГ | 120Δpur |
| Ампициллин/Ampicillin | 256–1024 | 2 |
| Амоксициллин/Amoxicillin | 512 | 4–8 |
| Пенициллин/Penicillin | 32–64 | 4 |
| Цефазолин/Cefazolin | 64–128 | 256 |
| Цефтриаксон/Ceftriaxon | 2–4 | 2 |
| Имипенем/Imipenem | 32 | 16 |
| Меропенем/Meropenem | 4 | 8–64 |

Примечания. *Величина МБК определена для микробной взвеси с концентрацией 10⁵ м.к./мл. **Представлены значения МБК в двух независимых экспериментах, каждая проба в каждом эксперименте была поставлена в трех повторах.

Notes. *Minimal bactericidal concentration (MBC) was determined for bacterial suspension 10⁵ CFU/ml. **There indicated results of MBC measurement in two independent experiments, in each of which each sample was placed in three replicates.

1,3 единиц. Уже на второй час скорость расщепления нитроцефина падала до 0,2–0,3 единиц оптической плотности за час, а через 6 ч снижалась до уровня фоновых колебаний оптической плотности контрольной среды.

Скорость расщепления нитроцефина клетками штамма *F. tularensis* 120Δpur среднеазиатского подвида была намного ниже — в осветленных

Таблица 4. Реципрокные титры пенициллина в жидкой питательной среде, определенные после культивирования в ней *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 120Δpur*

Table 4. Reciprocal penicillin titres in a liquid nutrient medium determined after growing of the *F. tularensis* strains 15 NIEG and 120Δpur*

| Штаммы <i>F. tularensis</i> <i>F. tularensis</i> strains | Время культивирования с пенициллином, ч Growing time with penicillin, h | Реципрокные титры Reciprocal titres |
|---|---|---|
| 15 НИИЭГ | 4 | 16 |
| 120Δpur | 4 | 1024 |
| 120Δpur | 24 | 32 |
| Нет No | 0 (control of penicillin) | 2048 |

Примечание. *Титр определяли методом стандартных разведений на культуре чувствительного к пенициллину штамма *F. tularensis* 15Δbla123. Указано последнее разведение, при котором отсутствовал видимый рост соответствующего штамма при концентрации микроорганизмов 10⁵ КОЕ/мл. Истощение пенициллина проводили путем 4- или 24-часового культивирования культур *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 120Δpur в среде с пенициллином 400 мкг/мл.

Note. *The titers were determined using penicillin-sensitive *F. tularensis* strain 15Δbla123 in standard tenfold dilutions. The last dilution in which there was no visible growth of 10⁵ CFU/ml indicated in the table. Penicillin depletion was performed by cultivation of *F. tularensis* 15 NIEG and 120Δpur during 4 or 24 hours in the presence of penicillin (400 μg/ml).

УЗД изменение оптической плотности за час составляло от 0,17 до 0,11 единиц, но при этом скорость расщепления субстрата держалась выше фоновых изменений оптической плотности среды в течение 16 ч.

Следует отметить, что осветленные клеточные лизаты демонстрировали более высокие значения оптической плотности и большую скорость расщепления нитроцефина по сравнению с суспензиями живых микробных клеток.

Мы определили максимальную скорость гидролиза субстрата, обеспечиваемого β-лактамазами в составе УЗЛ штаммов *F. tularensis*, и удельную активность УЗЛ штаммов в расчете на мг общего белка. Для штамма *F. tularensis* голактического подвида 15 НИИЭГ эти показатели составили 0,2275 ΔА/мин и 2,8261 ΔА/мин, а для штамма среднеазиатского подвида 120Δpur — 0,0007 ΔА/мин и 0,0086 ΔА/мин соответственно. Таким образом, относительная скорость реакции гидролиза β-лактамов для штамма 120Δpur составила 0,3% от скорости расщепления нитроцефина клетками *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Полученные данные свидетельствуют о том, что активность фермента лактамазы в штамме среднеазиатского подвида 120Δpur снижена не менее чем на два порядка по сравнению со штаммом голактического подвида 15 НИИЭГ.

Поиск генетических маркеров гена *blaB* *F. tularensis*, специфичных для подвида *mediasiatica*

Для изучения вариабельности генетических детерминант, обуславливающих β-лактамазную активность *F. tularensis* мы провели *in silico* анализ гена *blaB* (FTL_0879), кодирующего сериновую лактамазу BlaB (Bla2, FTU-1, YP_513599.1) (рис. 3).

Подвидоспецифические отличия *F. tularensis* среднеазиатского подвида ограничивались единичной нуклеотидной заменой гуанина на аденин (рис. 3А), и, как следствие, одной аминокислотой заменой в 97 положении — глицина на аргинин (рис. 3Б).

Подвидоспецифичность этой замены мы проверили на 17 штаммах среднеазиатского подвида, имеющих в нашей коллекции. Для этого мы воспользовались методом аллель-специфической (AS) ПЦР. Аллель-специфическая ПЦР осуществляется за счет двух AS-прямых праймеров, которые конкурируют за связывание с матрицей, и одного общего обратного праймера. При этом 3'-концевой нуклеотид каждого из прямых праймеров комплементарен одному из двух аллельных состояний изучаемого гена. При таком условии идеально совпадающий с матрицей праймер вытесняет из реакции несовпадающий из-за большей эффективности реакции.

Мы разработали пару AS-праймеров, которая позволила нам успешно определять методом AS-PCR нуклеотидную замену в гене

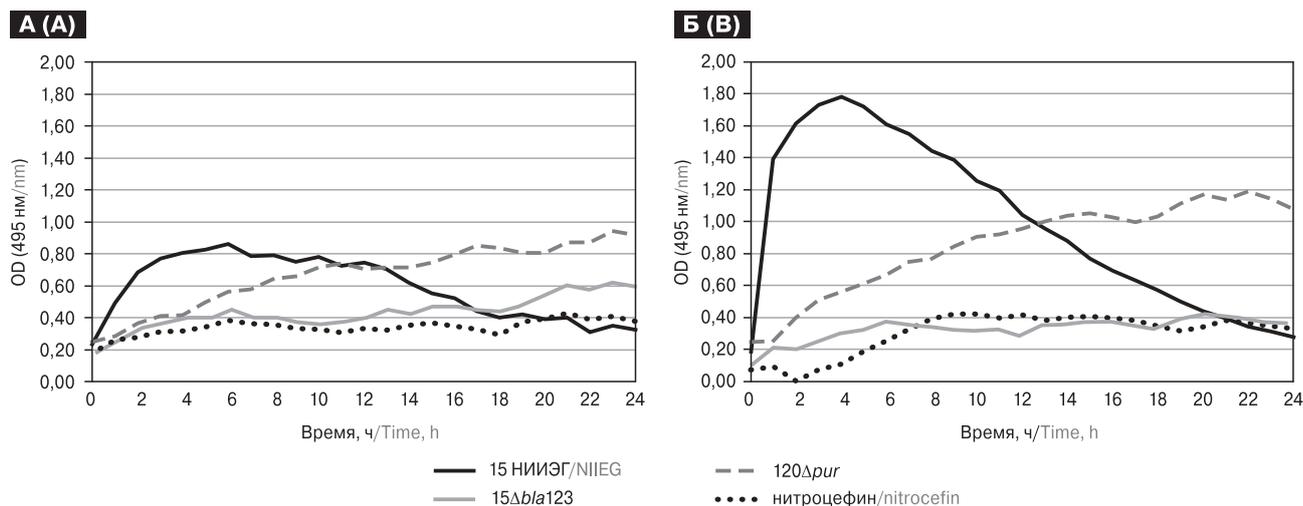


Рисунок 1. Динамика расщепления нитроцефина клетками *F. tularensis*

Figure 1. Dynamics of nitrocefina hydrolysis by *F. tularensis* cells

А) Живые культуры *F. tularensis*. Б) Осветленные УЗЛ живых культур *F. tularensis*. Оптическая плотность раствора отражает накопление продукта распада нитроцефина.

A) *F. tularensis* live cultures. B) Live cultures of *F. tularensis* clarified by ultrasound. The optical density (OD) of the solution represents the accumulation of the decomposition product of nitrocefina.

blaB, специфичную для среднеазиатского подвида *F. tularensis*: FA (forward ancestor) — ATCAAGATGATATTGGTAAACGCA; FD (forward derived) — cggggcgggcgggcgggcATCAAGATGATATTGGTAAACCCG; R (reverse) — CATCAGCAGTAATTATAGTATCGTTATCACC. Подчеркиванием обозначены аллель-специфичные нуклеотиды, жирным шрифтом — дестабилизирующие замены, строчными буквами — GC-последовательность, предназначенная для идентификации продукта реакции. Праймер

ФА является аллель-специфичным для подвида *mediasiatica F. tularensis*, праймер FD — для подвигов *tularensis*, *holarctica* и *novicida*. Специфичность реакции была повышена за счет включения в последовательность праймеров дополнительной точечной дестабилизирующей замены основания на некомплементарное в (–3) положении с 3'-конца обоих форвардных праймеров. Такой методический подход, называемый анализом амплификации с несоответствием — mismatch amplification mutation assay (Melt-MAMA), уве-

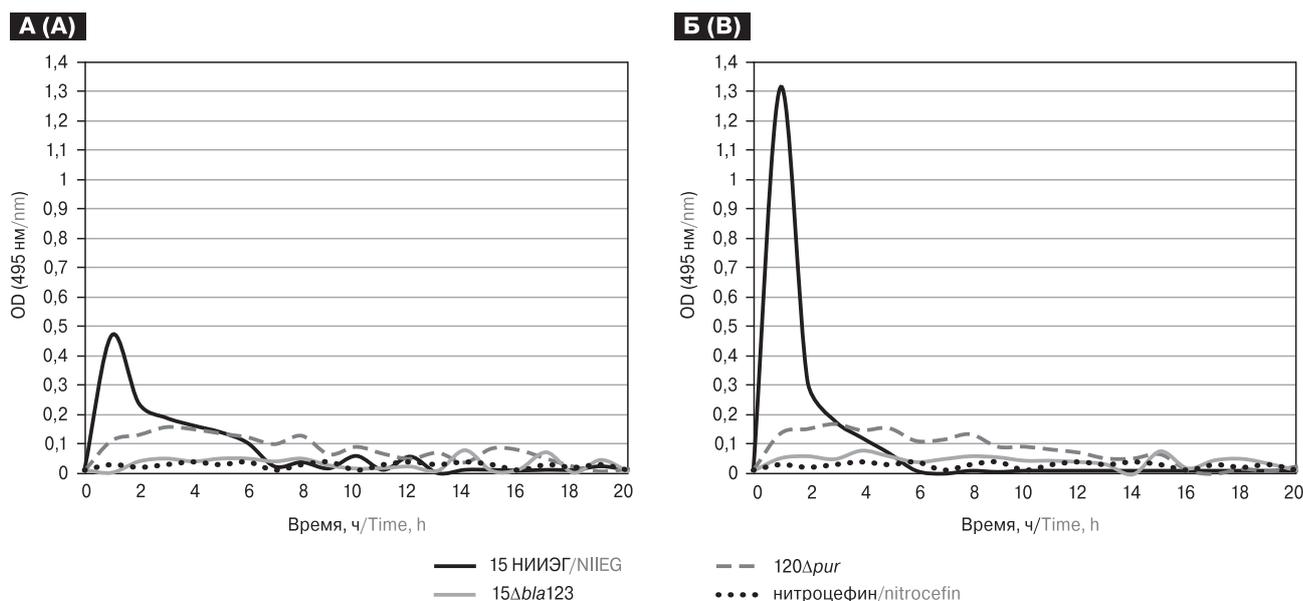


Рисунок 2. Изменение оптической плотности реакционной смеси в единицу времени (ΔOD)

Figure 2. Change in the optical density of the reaction mixture per unit time (ΔOD)

А) Живые культуры *F. tularensis*. Б) Осветленные УЗЛ живых культур *F. tularensis*.

A) Live cultures *F. tularensis*. B) Live cultures of *F. tularensis* clarified by ultrasound.

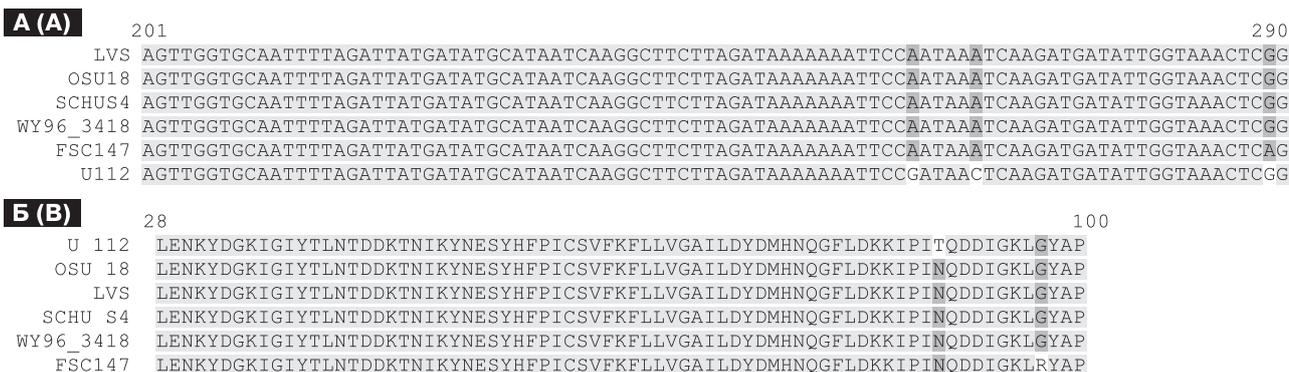


Рисунок 3. Множественное выравнивание нуклеотидных (А) и аминокислотных (Б) последовательностей β-лактамазы Bla2

Figure 3. Multiple alignment of nucleotide (A) and amino acid (B) sequences of β-lactamase Bla2

Штаммы *F. tularensis* подвидов: *mediasiatica* — FSC 147; *tularensis* — Schu S4, WY96-3418; *holarctica* — LVS, Osu 18; *novicida* — U 112.

Strains *F. tularensis* subspecies: *mediasiatica* — FSC 147; *tularensis* — Schu S4, WY96-3418; *holarctica* — LVS, Osu 18; *novicida* — U 112.

личивает преимущественную амплификацию фрагмента ДНК с того из прямых праймеров, чей 3'-концевой нуклеотид комплементарен детектируемому аллельному состоянию матрицы [9].

Мечение одного из AS-праймеров (FD) GC-последовательностью позволило нам увеличить размер получаемого с него ампликона, что, в свою очередь, дало возможность дифференцировать продукты AS-ПЦР в реальном времени с помощью анализа кривых их плавления.

На рисунке 4 представлены кривые плавления продуктов амплификации ДНК 8 штаммов туляремийного микроба, 3 из которых принадлежат к подвидам *holarctica* (15 НИИЭГ), *tularensis* (SCHU S4) и *novicida* (U 112), а пять — к подвиду *mediasiatica*.

На диаграмме кривых плавления видно, что амплификаты делятся на две группы, одна из которых имеет кривую плавления с максимумом 80°C, другая — 82°C. Большой температурный максимум кривой плавления продукта амплификации соответствует большему размеру ампликона, то есть ампликону, меченному GC-последовательностью. Соответственно, амплификаты, имеющие максимум 80°C, получены с праймера FA, специфичного для аллеля A/T. В свою очередь, амплификаты, имеющие максимум 82°C, получены с праймера FD, специфичного для аллеля G/C. К первой группе принадлежат все пять штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, ко второй — штаммы всех остальных подвидов. Аналогичные результаты были получены для всех 17-ти штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, использованных в данном исследовании.

Обсуждение

Определение кинетических характеристик β-лактамазной активности *F. tularensis* по накоплению продукта расщепления нитроцефина

и скорости его гидролиза показало, что штамм *F. tularensis* 120Δ*pur* среднеазиатского подвида, вопреки современным представлениям специалистов по туляремии, обладает β-лактамазной активностью, но при этом скорость гидролиза нитроцефина клетками этого штамма на порядки снижена по сравнению со штаммом *F. tularensis* голарктического подвида 15 НИИЭГ. Об этом же свидетельствуют результаты теста по истощению пенициллина в питательной среде — культуры как штамма голарктического подвида, так и среднеазиатского подвида значительно снижали концентрацию пенициллина в среде — в 250 и 125 раз соответственно, однако в первом случае это происходило в течение 4 ч, во втором — в течение суток.

С результатами кинетических исследований согласуется тот факт, что снижение концентрации микробных клеток *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 120Δ*pur* в питательной среде с антибиотиками группы пенициллинов приводит к появлению у них антибиотикочувствительности. По всей видимости, в условиях сниженной эффективности работы β-лактамаз удельная концентрация антибиотика на одну бактериальную клетку приобретает решающее значение. Именно поэтому при определении чувствительности к β-лактамам антибиотикам диско-диффузионным методом при использовании рекомендованных высоких концентраций микробных суспензий (10⁸–10⁹ м.к./мл) различий в уровнях резистентности штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* от штаммов других подвидов не было выявлено. Полученные нами результаты согласуются с недавними исследованиями М.В. Цимбалюкова и Н.В. Павлович [6]. Мы показали, что снижение концентрации бактериальных клеток *F. tularensis* подвида *mediasiatica* до 10⁵ м.к./мл и соответствующее увеличение нагрузки молекул антибиотика на клеточную стен-

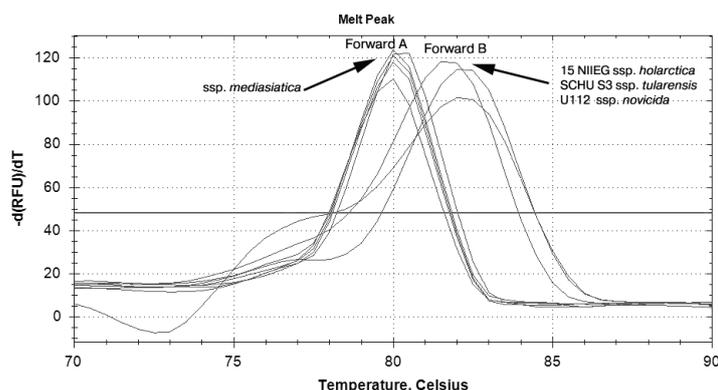


Рисунок 4. Кривые плавления, полученные в результате аллель-специфической ПЦР с ДНК-матрицей штаммов *F. tularensis* разных подвидов, с использованием пары конкурирующих праймеров FA и FD

Figure 4. Melting curves obtained as a result of allele-specific PCR with the DNA matrix of *F. tularensis* strains of different subspecies, using a pair of competing primers FA and FD

Примечание. Приведены данные одного репрезентативного эксперимента.

Note. The data of one representative experiment are presented.

ку одной микробной клетки приводит к декомпенсации ее β-лактамазного механизма и реализации бактерицидного эффекта антибиотика.

Следует отметить, что диагностическая ценность цветного нитроцефинового теста при подвидовой диагностике туляремии остается несомненной, позволяя дифференцировать штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* в первые часы исследования.

Исходя из того, что β-лактамазная активность осветленных ультразвуковых лизатов культур *F. tularensis* была выше таковой живых культур, можно предположить, что активная β-лактамаза *F. tularensis* расположена в периплазматическом пространстве, как у большинства грамотрицательных бактерий, и при лизисе высвобождается в окружающую среду. Данное предположение требует дальнейшего изучения путем выделения фермента непосредственно из периплазматического пространства и прямой оценки его активности.

С нашей точки зрения, выявленная нами *in silico* единичная аминокислотная замена Gly на Arg в 97 положении белка бета-лактамазы BlaB

в штамме *F. tularensis* FSC147 subsp. *mediasiatica* является вероятной причиной снижения активности этого фермента, обуславливая возможные конформационные изменения, приводящие либо к снижению сродства фермента к субстрату, либо к увеличению времени существования фермент-субстратного комплекса. Для окончательного ответа на этот вопрос требуются дальнейшие исследования с использованием методов генной инженерии.

Разработанная нами аллель-специфическая ПЦР позволила показать на панели из 17 штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, что замена G/A в 290 положении гена сериновой лактамазы *blaB* является специфичной для среднеазиатского подвида туляремийного микроба и может быть использована в качестве мишени для его ПЦР-идентификации.

Данная работа финансируется отраслевой научно-исследовательской программой Роспотребнадзора «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (2016–2020 гг).

Список литературы/References

1. Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis* // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. № 4 (102). С. 66–67. [Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khramov M.V. Simple liquid nutrient medium for molecular genetic investigations of *Francisella tularensis*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2009, no. 4 (102), pp. 66–67. (In Russ.)]
2. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края // Проблемы особо опасных инфекций. 2013. № 1. С. 66–69. [Mokrievich A.N., Timofeev V.S., Kudryavtseva T.Yu., Ulanova G.I., Karbysheva S.B., Mironova R.I., Vakhrameeva G.M., Gubareva T.I., Pavlov V.M., Dyatlov I.A. Isolation of Central Asian subspecies of tularemia agent in the Altai territory. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2013, no. 1, pp. 66–69. doi: 10.21055/0370-1069-2013-1-66-69 (In Russ.)]
3. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина, 1975. 192 с. [Olsufyev N.G. *Taksonomiya, mikrobiologiya i laboratornaya diagnostika возбуdivatelya tulyaremii* [Taxonomy, microbiology and laboratory diagnostics of the causative agent of tularemia]. Moscow: Medicine, 1975, 192 p.]

4. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Фосфатазная и пенициллиназная активности как стабильные признаки для дифференциации расовой принадлежности *Francisella tularensis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1992. № 11–12. С. 5–7. [Pavlovich N.V., Mishan'kin B.N. Phosphatase and penicillinase activities as stable traits for the differentiation of the racial classification of *Francisella tularensis*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1992, no. 11–12, pp. 5–7. (In Russ.)]
5. Цимбалистова М.В., Павлович М.В. Особенности формирования устойчивости *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* к бета-лактамам антибиотикам // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 1. С. 3–8. [Tsimbalistova M.V., Pavlovich M.V. Features of the formation of resistance *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* to beta-lactam antibiotics. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 1, pp. 3–8. (In Russ.)]
6. Ambler R.P. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1980, vol. 289, iss. 1036, pp. 321–331. doi: 10.1098/rstb.1980.0049
7. Antunes N.T., Frase H., Tothet M., Vakulenko S.B. The class A β -lactamase FTU-1 is native to *Francisella tularensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, vol. 56, no. 2, pp. 666–671. doi: 10.1128/AAC.05305-11
8. Bina X.R., Wang C., Miller M.A., Bina J.E. The Bla2 β -lactamase from the live-vaccine strain of *Francisella tularensis* encodes a functional protein that is only active against penicillin-class β -lactam antibiotics. *Arch. Microbiol.*, 2006, vol. 186, no. 3, pp. 219–228. doi: 10.1007/s00203-006-0140-6
9. Birdsall D.N., Pearson T., Price E.P., Hornstra H.M., Nera R.D., Stone N., Gruendike J., Kaufman E.L., Pettus A.H., Hurbon A.N., Buchhagen J.L., Harms N.J., Chanturia G., Gyuranecz M., Wagner D.M., Keim P.S. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, iss. 3:e32866. doi: 10.1371/journal.pone.0032866
10. Bou G., Oliver A., Ojeda M., Monzon C., Martinez-Beltran J. Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-Type plasmid-mediated β -lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, vol. 44, no. 9, pp. 2549–2553. doi:10.1128/AAC.44.9.2549-2553.2000
11. Champion M.D., Zeng Q., Nix E.B., Nano F.E., Keim P., Kodira C.D., Borowsky M., Young S., Koehrsen M., Engels R., Pearson M., Howarth C., Larson L., White J., Alvarado L., Forsman M., Bearden S.W., Sjöstedt A., Titball R., Michell S.L., Birren B., Galagan J. Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 5:e1000459. doi: 10.1371/journal.ppat.1000459
12. Grela E., Ząbek A., Grabowiecka A. Interferences in the optimization of the MTT assay for viability estimation of *Proteus mirabilis*. *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 159–167.
13. Kugeler K.J., Mead P.S., Janusz A.M., Staples J.E., Kubota K.A., Chalcraft L.G., Petersen J.M. Molecular epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, vol. 48, iss. 7, pp. 863–870. doi: 10.1086/597261
14. LoVullo E.D., Sherrill L.A., Perez L.L., Pavelka M.S. Genetic tools for highly pathogenic *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *Microbiology*, 2006, vol. 152, no. 11, pp. 3425–3435. doi: 10.1099/mic.0.29121-0
15. Montgomery K., Raymundo J.L., Drew W.L. Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 1979, vol. 92, no. 2, pp. 205–207.
16. Mörner T. The ecology of tularemia. *Rev. Sci. Tech.*, 1992, vol. 11, no. 4, pp. 1123–1130.
17. O'Callaghan C.H., Morris A., Kirby S.M., Shingler A.H. Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1972, vol. 1, pp. 283–288. doi: 10.1128/AAC.1.4.283
18. Olsufjev N.G., Meshcheryakova I.S. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 1983, vol. 33, no. 4, pp. 872–874. doi: 10.1099/00207713-33-4-872

Авторы:

Бахтеева И.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Кравченко Т.Б., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Рябко А.К., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Титарева Г.М., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Лев И.О., к.б.н., младший научный сотрудник отдела биотехнологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Мокриевич А.Н., д.м.н., зав. отделом особо опасных инфекции ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;
Тимофеев В.С., к.б.н., зав. лабораторией микробиологии сибирской язвы ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия.

Authors:

Bakhteeva I.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Microbiology of Anthrax, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Kravchenko T.B., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Microbiology of Anthrax, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Ryabko A.K., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Titareva G.M., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Microbiology of Anthrax, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Lev I.O., PhD (Biology), Junior Researcher, Department of Biotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Mokrievich A.N., PhD, MD (Medicine), Head of Department of Especially Dangerous Infection, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Timofeev V.S., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Microbiology of Anthrax, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.07.2017
 Отправлена на доработку 23.01.2018
 Принята к печати 27.02.2017

Received 11.07.2017
 Revision received 23.01.2018
 Accepted 27.02.2017