

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МОНІТОРИНГ У СИСТЕМІ ЕПІДНАГЛЯДУ ЗА ТУЛЯРЕМІЄЮ

Філія «Протичумний інститут імені І. І. Мечникова» Державної установи
«Центр громадського здоров'я МОЗ України», Одеса

На основі багаторічних досліджень проаналізовано стан проблеми туляремії в Україні. Визначено епізоотичну та епідемічну активність природних осередків в різних ландшафтно-географічних зонах (Полісся, Лісостеп, Степ) з детальною характеристикою генетичних та вірулентних властивостей ізольованих штамів *F. tularensis holarctica*. Встановлено видовий склад носіїв та переносників збудника туляремії, екологічні фактори, що забезпечують циркуляцію та резервацію *F. tularensis* у природних осередках різного типу. Проведений на основі MLVA ретроспективний молекулярно-генетичний аналіз 222 штамів збудника туляремії, що ізольовані на фоні епідускладнень та в міжепідемічні періоди, дав можливість ідентифікувати 48 генотипів (довгоперсистуючих, спільних, унікальних), які на основі алельних варіацій 5-ти VNTR-локусів (FT-M3, FT-M6, FT-M19, FT-M20, FT-M24) умовно розподілені на 3 групи (А, В, С). Визначено гетерогенність генотипової структури дослідженої популяції штамів *F. tularensis holarctica*, її еколого-генетичні особливості, географічне різноманіття генотипів та різні терміни циркуляції. Розроблено генетичні паспорти індивідуальних штамів *F. tularensis holarctica* та карти-схеми їх територіального розповсюдження. Вірулентні властивості штамів *F. tularensis* різних груп генотипів досліджували в системі двох експериментальних моделей *in vitro* та *in vivo*. В результаті проведених досліджень *in vitro* встановлено чіткі відмінності вірулентності між дослідженими патогенами *F. tularensis* та вакцинним штамом 15 Гайського. Виявлено, що *in vitro* для штамів генотипів групи А клітинами-мішенями були макрофаги, в яких визначали найбільш ранні та тяжкі ушкодження ядерного апарату, а для генотипів груп В і С та вакцинного штаму 15 Гайського – нейтрофіли з визначенням їх раннього завершеного апоптозу та еозинофіли з повною десекрецією гранул. Рання цитодеструкція макрофагів та апоптоз нейтрофілів є основними критеріями оцінки вірулентності штамів *F. tularensis*. Встановлено кореляцію результатів порівняльного вивчення вірулентності в системах двох моделей *in vitro* та *in vivo*. Найбільш високовірулентними та епідемічно значимими генотипами штамів *F. tularensis holarctica* були генотипи групи А, які зумовили групові випадки в різних регіонах та спалах туляремії в зоні Степу. Отримані результати стали основою для розробки комплексу науково обґрунтованих рекомендацій з оптимізації системи епіднагляду за туляремією в Україні з впровадженням молекулярно-генетичного моніторингу природних осередків, що підвищить рівень безпеки населення.

Ключові слова: туляремія, природні осередки, штами *F. tularensis holarctica*, молекулярне генотипування, вірулентність, епіднагляд.

Z. M. Nekhoroshykh, N. M. Protsyshyna, V. O. Samoilenko,
N. M. Mankovska, M. O. Zagoruyko, D. A. Bondarenko

MOLECULAR AND GENETIC MONITORING IN THE SYSTEM OF EPIDEMIC SURVEILLANCE FOR TULAREMIA

Branch "Anti-plague institute names I. I. Mechnykova" of the State institution
"Public health center of the Ministry of health of Ukraine", Odesa, Ukraine

The state of the tularemia problem in Ukraine was analysed based on many years of research. The epizootic and epidemic activity of natural foci in different landscape-geographic zones (marshy woodlands, forest-steppe, steppe) was determined with a detailed description of the genetic and virulence properties of isolated strains of *F. tularensis holarctica*. The species composition of reservoirs and carriers of the causative agent of tularemia, environmental factors ensuring the circulation and reservation of *F. tularensis* in natural foci of various types have been established. The MLVA-based retrospective molecular genetic analysis of 222 strains of the causative agent of tularemia, isolated during epidemic complications and in inter-epidemic periods, made it possible to identify 48 genotypes (long-persistent, shared, unique), which, based on allelic variations of 5 VNTR loci (FT -M3, FT-M6, FT-M19, FT-M20, FT-M24) are conditionally divided into 3 groups (A, B, C). The heterogeneity of the genotypic structure of the studied population of *F. tularensis holarctica* strains, its ecological and genetic features, geographical diversity of genotypes and different period of their circulation were determined. Genetic passports of individual strains of *F. tularensis holarctica* and maps of their territorial distribution were developed. The virulence

properties of *F. tularensis* strains of different groups of genotypes were studied in the system of two experimental models, *in vitro* and *in vivo*. As a result of the *in vitro* studies, clear differences in virulence were established between the investigated pathogens of *F. tularensis* and the vaccine strain 15 of Gaiskiy. It was found that *in vitro* for strains of genotypes of group A, the target cells were macrophages, in which the earliest and most severe damage to the nuclear apparatus was determined, and for genotypes of groups B and C and vaccine strain 15 of Gaiskiy, neutrophils with determination of their early completed apoptosis and eosinophils with complete desecretion of granules. Early cytodestruction of macrophages and apoptosis of neutrophils are the main criteria for evaluating the virulence of *F. tularensis* strains. A correlation of the results of a comparative study of virulence in the systems of two *in vitro* and *in vivo* models was established. The most highly virulent and epidemically significant genovariants of *F. tularensis holarctica* strains were genotypes of group A, which caused group cases in different regions and an outbreak of tularemia in the steppe zone. The obtained results became the basis for the development of a set of scientifically based recommendations for optimizing the tularemia surveillance system in Ukraine with the introduction of molecular genetic monitoring of natural foci, which will increase the level of public safety.

Keywords: tularemia, natural foci, *F. tularensis holarctica* strains, molecular genotyping, virulence, surveillance.

Вступ. Туляремія – зоонозна природно-осередкова особливо небезпечна інфекція (ОНІ), збудник якої *Francisella tularensis* (*F. tularensis*) – високовірулентний критичний патоген (вища категорія «А») може бути використаний як біологічна зброя [1, 2]. Туляремія зареєстрована на всіх континентах і має широке коло носіїв та переносників, різні шляхи передачі збудника та різноманітні клінічні форми [3–7].

В Україні на всій території виявлені численні стійкі природні осередки туляремії, які протягом багатьох десятиліть зберігають свій епізоотичний та епідемічний потенціал з циркуляцією штамів підвиду *F. tularensis holarctica* [8–10]. Більшість ензоотичних територій з туляремії характеризуються періодичними епізоотіями, локальними спалахами та спорадичними випадками захворювань людей.

Епідеміологічна ситуація з туляремії в країні залишається напруженою через відсутність специфічної профілактики інфекції, зменшення протиензоотичних заходів на ензоотичних територіях, недостатній рівень своєчасної, вірогідної діагностики, у зв'язку з чим справжня захворюваність людей значно вища, ніж зареєстрована [11,12].

Зазначене свідчить про необхідність епіднагляду за природними осередками туляремії з визначенням їх епідпотенціалу, біоценотичної структури та біологічних властивостей циркулюючих штамів *F. tularensis holarctica*. На сьогодні ефективна система епіднагляду за туляремією неможлива без використання молекулярно-генетичного моніторингу, який дає можливість дослідити структуру популяції збудника, виявити епідемічно значимі високовірулентні штами, можливі геномодифіковані варіанти, що забезпечить своєчасне реагування на біозагрозу, прогнозування епідситуації та проведення адекватної її корекції. Проведені нами дослідження присвячені зазначеним проблемам.

Мета дослідження. Визначити епідемічний потенціал природних осередків туляремії на території України та провести молекулярно-генетичний аналіз структури популяції *F. tularensis holarctica*.

Матеріали і методи. При дослідженні польового матеріалу з метою виявлення туляреміїної інфекції застосовували еколого-зоологічні, бактеріологічні, біологічні, імунолюмінесцентні, серологічні (РПГА, РНГА, РНАт), а також молекулярно-біологічні методи: ПЛР – для виявлення ДНК *F. tularensis*, що проводили з використанням комерційних діагностикумів та авторської

мультиплексної генодіагностичної ПЛР-тест-системи (патент 75546) [13–14], MLVA (*Multilocus VNTR Analysis, MLVA*) – для генотипування індивідуальних штамів збудника туляремії [15–16].

Вірулентні властивості штамів *F. tularensis* досліджували з використанням двох експериментальних моделей: *in vitro* – при взаємодії збудника туляремії з клітинами периферійної крові людини (ПКЛ) (патент UA 37715) [17] та *in vivo* – з клітинами паренхіматозних органів білих мишей. Як контрольний зразок був використаний вакцинний штам *F. tularensis* 15 Гайського.

Проводили ретроспективний аналіз річних звітів відділів ОНІ, УНДПЧІ ім. І. І. Мечникова, карт епідеміологічних обстежень хворих, екстрених повідомлень про туляремію, застосовували також методи клініко-епідеміологічного та статистичного аналізу.

Результати досліджень та їх обговорення. На території різних ландшафтно-географічних зон України (Полісся, Лісостеп, Степ) (рис. 1) зареєстровано природні осередки туляремії, епізоотична активність яких підтверджується майже щорічною ізоляцією штамів підвиду *F. tularensis holarctica* з біотичних та абіотичних об'єктів.

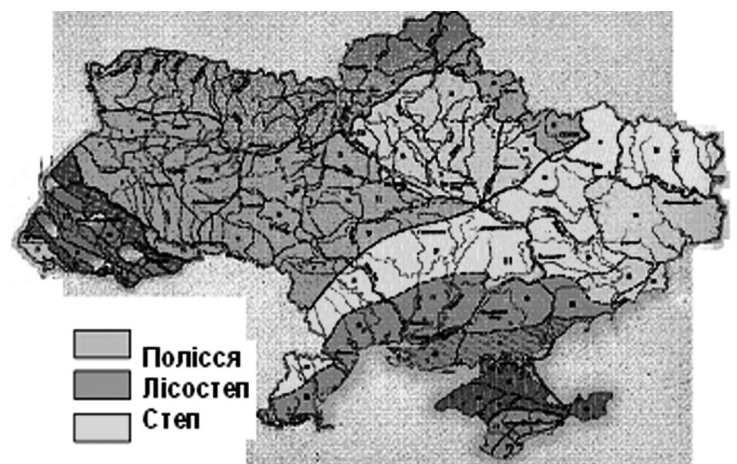


Рис. 1. Ландшафтно-географічні зони України

На основі багаторічних еколого-епізоотологічних досліджень встановлено, що природні осередки туляремії на території України представлені 4 ландшафтними типами: заплавно-болотними – 39,0%, луго-польовими – 30,8%, лісовими – 18,7% та степовими – 10,0%, не встановлені – 1,5% (рис. 2).

Оригінальні дослідження

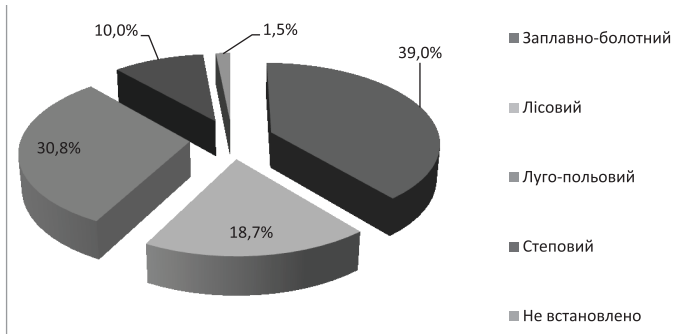


Рис. 2. Розподіл природних осередків за різними типами в Україні

В зоні Полісся домінують запlavно-болотні осередки – (66,5±5,0)%, лісові – (27,5±5,0)%, луго-польові – (6,0±3,0)%; в Лісостепу луго-польові – (58,8±7,0)%, запlavно-болотні – (21,9±6,0)%, лісові – (16,8±4,0)%, степові – (2,5±2,0)%; в зоні Степу домінують степові – (57,1±9,0)%, луго-польові – (32,1±9,0)%, запlavно-болотні – (10,7±8,0)%. Найбільша кількість ензоотичних територій з туляремії виявлена в зонах Полісся та Лісостепу (84,0%).

Природні осередки туляремії, які зареєстровані в різних зонах, мають відмінності з біоценотичної структури та епізоотичної і епідемічної активності (рис. 3).

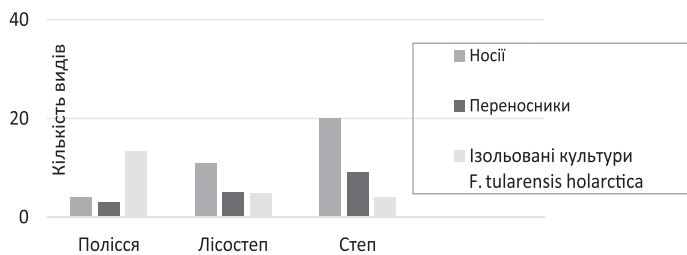


Рис. 3. Порівняльна характеристика ландшафтних зон України за кількістю видів носіїв, переносників та ізолюваних культур *F. tularensis*

Встановлено, що в зоні Полісся ізолювано значно більшу кількість штамів *F. tularensis holarctica* – 133, Лісостепу – 49, Степу – 40. В зоні Степу визначена найбільша кількість носіїв збудника – до 20 видів ссавців, в тому числі фонових (миша польова, лісова, хатня, курганцева, полівка звичайна, заєць сірий та інші); в зоні Лісостепу – 11, серед яких 8 різних видів мишей, а також заєць-русак, ондатра, бурозубка звичайна; в Поліссі – лише 4 види ссавців: миша хатня та полівки водяна, звичайна, руда.

Основними переносниками збудника туляремії на території всіх трьох зон є кліщі *Ixodes ricinus*,

Dermacentor reticulatus, *Dermacentor pictus*, але в зоні Степу виявлено більше 10 видів кліщів.

На основі аналізу отриманих результатів встановлено, що резервація та поширення збудника туляремії в об'єктах довкілля були значно більшими в зонах Степу та Лісостепу, ніж в Поліссі. Зона Степу має найсприятливіші екологічні умови для персистенції *F. tularensis*, збільшення чисельності носіїв, переносників та їх міграції, що є факторами розповсюдження збудника та активізації природних осередків туляремії. В Степовій зоні виявлено природні осередки з тривалістю активності, що перевищувала дворічний період, водночас як в Поліссі та Лісостепі природні осередки проявляли свою активність протягом 1–2-х років.

Епідемічні ускладнення з туляремії є результатом підвищення активності епізоотичних процесів у природних осередках, що зумовлено максимальною чисельністю основних носіїв та переносників інфекції. Причинами активізації довгоіснуючих природних осередків туляремії можуть бути молекулярно-біологічні властивості збудника і його хазяїв, мутаційні та мікро-еволюційні процеси в біоценозах [18].

Наразі в Україні важливим фактором активізації природних осередків туляремії є бойові дії. Зона проведення бойових дій є територією з високим біоризиком, де може спостерігатись активізація природних осередків різних ОНІ, в тому числі туляремії, що зумовлена як катастрофічною руйнацією екосистеми, так і застосуванням *F. tularensis* в ролі біологічної зброї. Зазначена ситуація створює значні ризики для особового складу військових сил України та місцевого населення і потребує особливої уваги до їх біобезпеки.

Ефективний епіднадгляд за туляремією базується на системному підході до проведення епізоотологічного моніторингу на ензоотичних територіях на основі критеріїв оцінки ступеню їх епідемічної загрози. На основі досліджень, що проведені в нашому інституті, визначено 2 типи адміністративних територій за ступенем епідемічного ризику зараження *F. tularensis*: 1-й тип – території високого епідемічного ризику, куди віднесено 10 областей: Сумська, Чернігівська, Волинська, Рівненська, Полтавська, Харківська, Львівська, Одеська, Херсонська (Генічеський район), Запорізька (Акимівський район) і АР Крим. Інші області віднесені до 2-го типу територій з низьким епідемічним ризиком зараження *F. tularensis* [19] (рис. 4).



Рис. 4. Розподіл території України за ступенем епідемічного ризику зараження на туляремію

Встановлено, що на територіях 1-го типу зареєстровано близько 85% всієї захворюваності на туляремію, що зумовлює необхідність щорічних епізоотологічних досліджень з визначенням активності природних осередків та проведення планової імунізації проти туляремії контингентам із високим ризиком зараження.

В Україні туляремія вперше була виявлена в 1934 році минулого століття і за період впродовж 1941–1944 рр. неодноразово виникали значні спалахи інфекції. Обов'язкова реєстрація туляремії введена з 1941 року. Найвищий рівень захворюваності спостерігали в 1945–1949 роках, коли в зоні Лісостепу було зареєстровано 56 357 випадків, Степу – 9 866, Полісся – 98 випадків. З 1949 року була розпочата масова імунізація сільського населення, яка разом із проведенням протиепідемічних заходів сприяла значному зниженню захворюваності.

В 1952 році реєстрували спалахи туляремії в Криму (245), в 1955 році – в Рівненській (321) і Волинській (378) областях. За період впродовж 1960–1997 років в Україні виявляли спорадичні або групові випадки туляремії – 1962, 1963 рік 48 та 31 випадок, відповідно. Але в зоні Степу (Одеська та Миколаївська обл.) в 1997–1998 роках зареєстровано значний спалах туляремії (100 випадків), а в зоні Полісся (Сумська обл.) в 2004, 2005 та 2011 роках групові випадки – 10, 6, 11, відповідно. Останнім часом в Україні реєструють переважно спорадичні випадки туляремії.

На території різних досліджених зон за період впродовж 1967–2018 років виділено 222 природних ізоляти *F. tularensis* з різних джерел (дикі ссавці – 50, кліщі – 125, вода – 43, люди – 4).

Для молекулярно-генетичного підтвердження видової належності досліджених природних ізолятів застосовували ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів до фрагменту гена *lprA* туляремієного мікроба (386 п.н.), який забезпечує індикацію *F. tularensis* до рівня виду. На основі проведеного ПЛР-аналізу виявлено, що у всіх природних ізолятів молекулярна вага ампліконів ДНК складала 386 п.н., що дозволило віднести їх до виду *F. tularensis*.

Підвидову ідентифікацію ізолятів проводили за VNTR-локусами FT-M19 та FT-M24. Молекулярна вага ампліконів даних локусів у всіх досліджених штамів була ідентичною: FT-M19 – 220 п.н., FT-M24 – 500 п.н., що характерно для підвиду *F. tularensis holarctica*. Отримані дані дали можливість віднести досліджені штамів до підвиду *F. tularensis holarctica* (рис. 5).

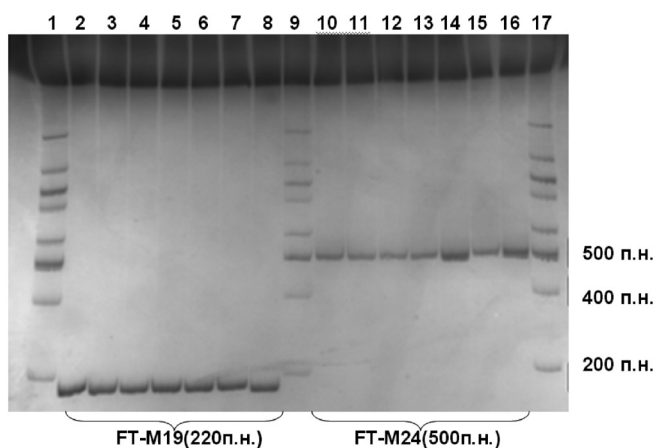


Рис. 5. Ідентифікація підвиду *F. tularensis holarctica*

Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК природних ізолятів *F. tularensis holarctica* за VNTR-локусами FT-M19, FT-M24 в 6% поліакриламідному гелі: лунки 1, 9, 17 – маркер молекулярних мас 1 kb plus DNA ladder, лунки 2–7, 10–15 штамів *F. tularensis holarctica* 12, 22/76, 22/77, 22/78, 22/79, 76; лунки 8, 16 – вакцинний штам *F. tularensis* 15 Гайського.

Молекулярне генотипування ізольованих штамів *F. tularensis holarctica* проводили за 5-ма VNTR-локусами: FT-M3, FT-M6, FT-M19, FT-M20 та FT-M24 з визначенням алельних варіацій зазначених локусів, їх молекулярної ваги та кількості повторів (рис. 6).

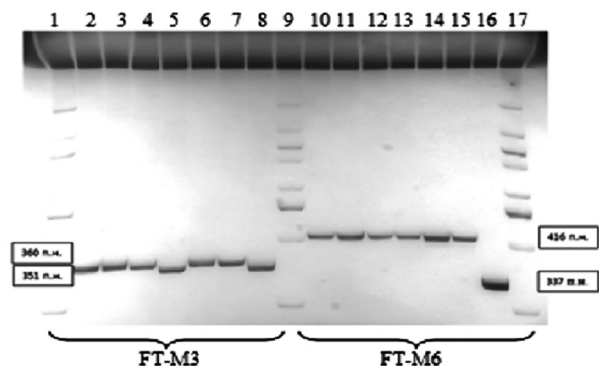


Рис. 6. Генотипування природних ізолятів *F. tularensis holarctica*

Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК природних ізолятів *F. tularensis* в 6% поліакриламідному гелі локусів FT-M3 і FT-M6. Лунки 1, 9, 17 – маркер молекулярних мас 1 kb plus DNA ladder, лунки 2–7, 10–15 – штамів *F. tularensis holarctica* 12, 22/76, 22/77, 22/78, 22/79, 76, лунки 8, 16 – вакцинний штам *F. tularensis* 15 Гайського.

Всі досліджені штамів за культурально-морфологічними, біохімічними властивостями, а також на основі ПЛР-аналізу, були ідентифіковані як представники виду *F. tularensis* та підвиду *F. tularensis holarctica*.

На основі MLVA нами проведено ретроспективний молекулярно-генетичний аналіз значної колекції штамів *F. tularensis holarctica*, серед яких ідентифіковано 48 генотипів (спільних, довгоперсистуючих, унікальних), які за алельними варіаціями 5-ти VNTR-локусів (FT-M3, FT-M6, FT-M19, FT-M20, FT-M24) з високою кореляцією між молекулярною вагою досліджених локусів та кількістю повторів в них, умовно розподілені на 3 групи (A, B, C).

До групи А ввійшов 31 генотип (178 штамів), групи В – 9 генотипів (25 штамів), групи С – 8 генотипів (19 штамів). Встановлено, що довгоперсистуючі генотипи (A5, A6, A8, A12, A16) та генотип групи С (C11) циркулювали на території всіх трьох зон від 13 до 41 року. Генотипи групи А штамів *F. tularensis* виявлені на території різних регіонів України з 70-х років минулого століття, а групи В і С – починаючи з 2000 року.

Встановлено, що штамів *F. tularensis* генотипів групи А розповсюджені на території всіх 3-х зон, групи В – в зоні Полісся, групи С – на територіях із високим рівнем зволоження (рис. 7).

Виявлено гетерогенність генотипової структури дослідженої популяції штамів *F. tularensis*, але найбільше генотипове різноманіття патогенів визначено в зоні активних природних осередків Полісся (20 унікальних генотипів), а в зонах Лісостепу та Степу – лише 10.



Рис. 7. Географічне поширення штамів *F. tularensis holarctica* різних груп генотипів (А, В, С) на території України

Проведене на основі MLVA ретроспективне молекулярне генотипування регіональних штамів *F. tularensis* дало можливість визначити унікальні комбінації їх VNTR-локусів, різні терміни циркуляції генотипів, певну географічну приуроченість та встановити еколого-генетичні особливості структури популяції збудника туляремії, що циркулює в Україні. На основі отриманих результатів розроблено генетичні паспорти індивідуальних штамів *F. tularensis holarctica* та карти-схеми їх територіального розповсюдження.

Значним розділом нашої роботи було дослідження вірулентних властивостей ізолюваних штамів *F. tularensis holarctica*, що проведені з використанням двох експериментальних моделей *in vitro* та *in vivo*.

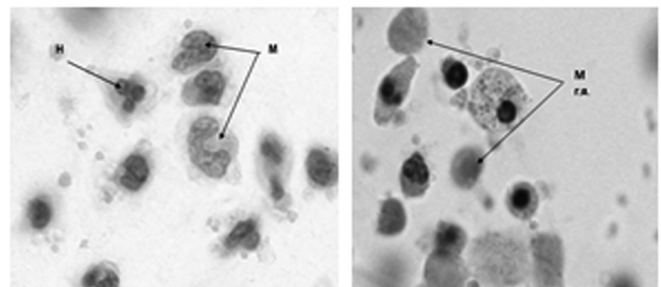
При проведенні досліджень *in vitro* за розробленим в нашому інституті високоінформативним методом (патент 37 715) у культурі клітин лейкоцитів периферійної крові людини – ПКЛ (макрофаги, нейтрофіли, еозинофіли та інші) в динаміці розвитку експериментальної туляремійної інфекції вірулентність штамів оцінювали за термінами цитодеструктивних змін у клітинах ПКЛ, ступенем тяжкості ушкоджень та інтенсивністю репродукції збудника.

Водночас цитодеструкцію клітин ПКЛ визначали в перші 24 години дослідження, коли ще збережений моношар інфікованих клітин. Зазначимо, що саме в макрофагах проходить репродукція *F. tularensis* і головними мішенями збудника є клітинні мембрани та ядерний хроматин.

Встановлено, що уже в перші 2–4 години після інфікування *F. tularensis* клітин ПКЛ виявляли ранні, тяжкі ушкодження ядерного апарату макрофагів (деформацію, гомогенізацію, гнізду агрегацію хроматину ядер). Паралельно з ушкодженнями макрофагів під дією штамів *F. tularensis* виявляли значні деструктивні зміни нейтрофілів: вакуолізацію їх цитоплазми, швидкий розвиток завершеного апоптозу зі злиттям сегментів, що свідчило про повне пригнічення їх функціональної та хемотаксисної активності.

Вважаємо, що рання цитодеструкція макрофагів та апоптоз нейтрофілів є одним із найбільш демонстративних та основних критеріїв оцінки вірулентності *F. tularensis*. Досліджені штами *F. tularensis* зумовлювали також виражену деструкцію структури еозинофілів до повної десекреції гранул. Через 24 години після

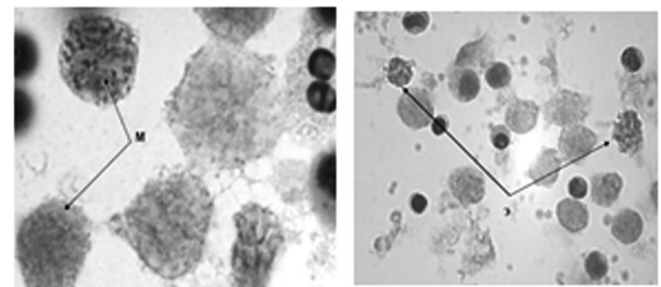
інфікування клітин ПКЛ спостерігали повну руйнацію еозинофілів з залишками лише фрагментів їх цитоплазми (рис. 8 а, b, c, d).



а
Контроль клітин ПКЛ, 4 год.

б
Гомогенізація ядер макрофагів, апоптоз нейтрофілів, штам 348 (A23), 4 год

Забарвлення гематоксильно-еозином. Збільшення $\times 1200$



с
Гніздна агрегація хроматину ядер макрофагів, штам 529 (A8), 24 год.

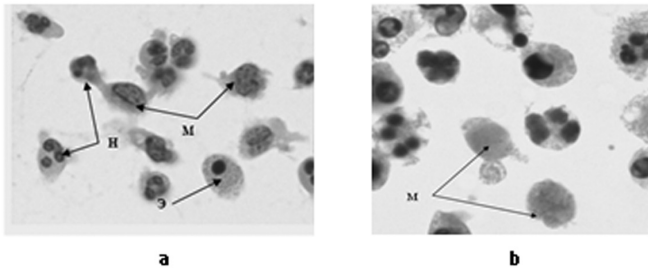
д
Фрагменти цитоплазми еозинофілів, штам 241 (A6), 24 год

Рис. 8 а, б, с, d. Цитодеструктивні ушкодження *in vitro* клітин ПКЛ — макрофагів (М), нейтрофілів (Н), еозинофілів (Е) під дією вірулентних штамів *F. tularensis*

Встановлено, що для штамів *F. tularensis* генотипів групи А клітинами-мішенями були макрофаги, а штами генотипів груп В і С зумовлювали значні деструктивні зміни структури нейтрофілів та еозинофілів — клітин-мішеней для зазначених груп генотипів.

Важливо зазначити, що нейтрофіли були також клітинами-мішенями для вакцинного штаму 15 Гайського. До того ж найбільш демонстративні цитоморфологіч-

ні відмінності між вакцинним і вірулентними штамми *F. tularensis* спостерігали через 4 і 24 години після зараження клітин ПКЛ. Під дією вакцинного штаму через 4 години клітини ПКЛ, в тому числі макрофаги, зберегли свою структуру, водночас як при взаємодії зі штамми *F. tularensis* виявляли виражену цитодеструкцію ядерного апарату макрофагів (рис. 9 а, б).



Збереження клітин ПКЛ (макрофаги, нейтрофіли, еозинофіли). Вакцинний штам *F. tularensis* 15 Гайського, 4 год.

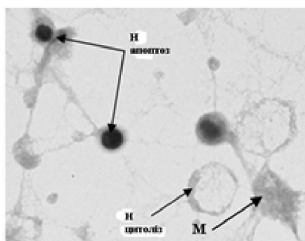
Гомогенізація ядер макрофагів, штам *F. tularensis holarctica* 76, 4 год.

Забарвлення гематоксилин-еозином. Збільшення $\times 1200$

Рис. 9 а, б. Порівняльна характеристика цитодеструктивних ушкоджень клітин ПКЛ під дією вакцинного штаму 15 Гайського та вірулентного штаму 76

Через 24 години після інфікування клітин ПКЛ під дією вакцинного штаму 15 Гайського у нейтрофілів виявляли повний цитоліз, у частини макрофагів гомогенізацію ядер, що підтверджує його збережену здатність до репродукції в макрофагах (рис. 10).

Отримані результати свідчать про те, що вакцинний штам *F. tularensis* 15 Гайського, незважаючи на ослаблену вірулентність, не є повністю безпечним для людини, оскільки *in vitro* зумовлює повний цитоліз нейтрофілів ПКЛ та має здатність до репродукції в макрофагах без їх вираженої деструкції.



Апоптоз та повний цитоліз нейтрофілів ПКЛ. Деспіралізація хроматину ядер макрофагів. Вакцинний штам *F. tularensis* Гайського, 24 год. Забарвлення гематоксилин-еозином. Збільшення $\times 1200$

Рис. 10. Цитодеструктивні зміни клітин ПКЛ під дією вакцинного штаму *F. tularensis* 15 Гайського

При порівняльному вивченні *in vitro* вірулентності різних груп генотипів штамів *F. tularensis* найбільший відсоток ранньої та тяжкої цитодеструкції макрофагів виявлено під дією генотипів групи А, що свідчило про їх дуже високу вірулентність (рис. 11).

При порівняльному вивченні *in vitro* вірулентності різних груп генотипів штамів *F. tularensis* найбільший відсоток ранньої та тяжкої цитодеструкції макрофагів виявлено під дією генотипів групи А, що свідчило про їх дуже високу вірулентність (рис. 11).

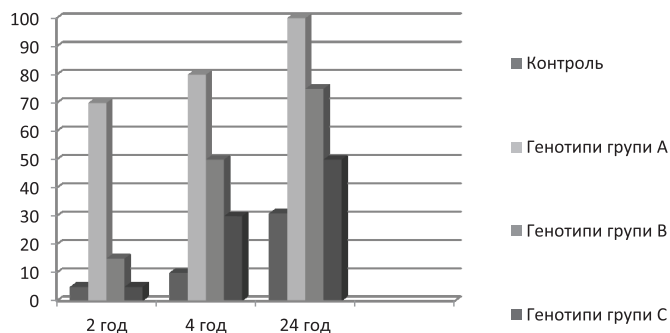


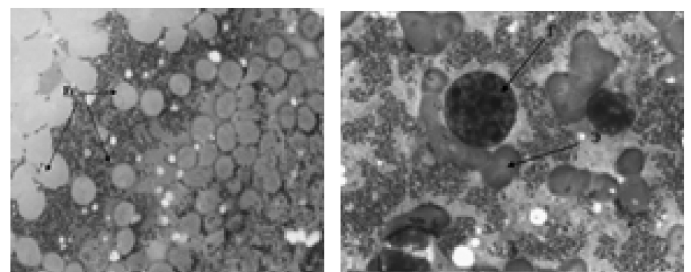
Рис. 11. Динаміка розвитку *in vitro* цитодеструктивних ушкоджень макрофагів під дією вірулентних штамів *F. tularensis holarctica* різних груп генотипів

Підтверджена найбільш значна вірулентність у штамів *F. tularensis* генотипів групи А, які ізольовані з різних джерел, в тому числі від людей на фоні епіду-складень.

В результаті проведених експериментальних досліджень *in vitro* встановлено суттєві відмінності фенотипових проявів вірулентності ізольованих патогенів *F. tularensis holarctica* та вакцинного штаму 15 Гайського, рецепторна специфічність яких не ідентична. Вірулентні штам *F. tularensis* високоспецифічні до макрофагів, а вакцинний — до нейтрофілів, що свідчить про різну структурну композицію біологічно активних молекул, які секретуються в процесі їх взаємодії з клітинами-мішенями.

Вірулентність досліджених штамів *F. tularensis* паралельно вивчали *in vivo* на біомоделі білих мишей в системі клітин паренхіматозних органів (гепатоцити, макрофаги, нейтрофіли, лімфоцити). Виявлено, що склад клітин паренхіматозних органів білих мишей зазнавав значних ушкоджень, що призводило до їх повного руйнування.

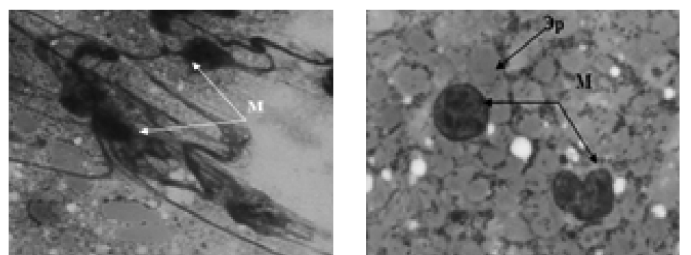
При розвитку бактеріємії в процесі експериментальної туляреміїної інфекції *in vivo* *F. tularensis* фіксується на еритроцитах, що сприяє системному розповсюдженню збудника та розвитку генералізації інфекції (рис. 12 а, б, с, d).



Репродукція *F. tularensis* на еритроцитах білих мишей, штам 348, А23, клітини печінки

Зливне накопичення *F. tularensis*, гемоліз еритроцитів, штам 341, А16; клітини печінки

Забарвлення за Романовським-Гімзою. Збільшення $\times 1200$



Повна руйнація клітин, штам 146, А22/5, клітини селезінки

Незначна репродукція *F. tularensis*, деформовані еритроцити, штам 365, С14, клітини селезінки

Рис. 12 а, б, с, d. Цитодеструкція *in vivo* клітин паренхіматозних органів білих мишей під дією високовірулентних штамів *F. tularensis*

Найважчу цитодеструкцію інфікованих клітин та значне накопичення збудника *in vivo* спостерігали під дією штамів *F. tularensis* генотипів групи А, водночас як під впливом генотипів груп В і С — лише незначну репродукцію збудника.

Таблиця 1. Нові генотипи штамів *F. tularensis* на півдні України

№ штам	Генотип	Зона/область	Джерело ізоляції	Рік ізоляції	Генетичний паспорт штаму
					Код локуса: А – FT-M3, В – FT-M6, С – FT-M19, D – FT-M20, Е – FT-M24 молекулярна вага (кількість повторів)
341	A16'	Степ/Одеська	Миша лісова <i>Sylvaeus sylvaticus</i>	2016	A ₃₇₈₍₁₉₎ B ₃₁₁₍₄₎ C ₂₂₀₍₀₎ D ₂₅₅₍₃₎ E ₅₀₀₍₂₎
345	A11'	Степ/Одеська	Миша лісова <i>Sylvaeus sylvaticus</i>	2016	A ₃₆₀₍₁₇₎ B ₃₁₁₍₄₎ C ₂₂₀₍₀₎ D ₂₅₅₍₃₎ E ₅₀₀₍₂₎
352	A2''	Степ/Одеська	Миша лісова <i>Sylvaeus sylvaticus</i>	2016	A ₃₆₀₍₁₆₎ B ₄₀₀₍₇₎ C ₂₂₀₍₀₎ D ₂₅₅₍₃₎ E ₅₀₀₍₂₎
12	C11'	Степ/Одеська	Кліщі <i>Dermacentor marginatus</i>	2017	A ₃₅₁₍₁₆₎ B ₄₁₆₍₇₎ C ₂₂₀₍₀₎ D ₂₆₇₍₄₎ E ₅₀₀₍₂₎

На основі проведених досліджень встановлено кореляцію результатів порівняльного вивчення вірулентності штамів *F. tularensis* з використанням двох експериментальних моделей *in vitro* та *in vivo*. Визначення вірулентних властивостей регіональних штамів *F. tularensis* дає можливість встановити активність епізоотичних та епідемічних процесів у природних осередках туляремії та може служити критерієм оцінки їх епідпотенціалу та прогнозування можливих епідускладнень.

Нами проведені також дослідження з вивчення вірулентності генотипів різних груп штамів *F. tularensis* на фоні підйому захворюваності та в міжепідемічні періоди. При цьому, встановлено, що в міжепідемічні періоди циркулювали генотипи всіх трьох груп А, В, С, водночас як на фоні підйому захворюваності виявляли практично лише генотипи групи А.

Зокрема, в зоні Степу під час спалаху туляремії (1997–1998 роки) із різних джерел (смавці, вода) ізолювано 9 штамів *F. tularensis*. Водночас ідентифіковано 8 генотипів групи А (A6, A10, A11, A12, A13, A15, A21, A22/5), з яких три (A13, A15, A22/5) – унікальні, що циркулювали тільки в Одеській області. Виявлений генотип A22/5 штаму *F. tularensis* (миша хатня, 1998 р.), який до сьогодні зберігає високу вірулентність *in vitro* та *in vivo*, на території України більше не циркулював.

Останніми роками (2016–2017) в зоні Степу (Одеська обл.) на фоні значної епізоотії серед дрібних ссавців фонових видів (миша лісова) виділено 18 ізолятів *F. tularensis* (15 – кліщі, 3 – миша лісова), серед яких ідентифіковано три нових високовірулентних генотипи A2'', A11', A16', що свідчило про функціонування в Одеській області активного природного осередку туляремії (табл. 1).

В зоні Полісся за період з 2000 до 2011 років з різних джерел (дрібні ссавці, кліщі, вода, люди) ізолювано 26 штамів *F. tularensis holartica* та ідентифіковано 11 генотипів групи А (A1, A2, A4', A5, A12, A14, A16, A17, A19, A21, A23). На фоні ускладнень епідемічної ситуації (2000, 2005) від хворих людей ізолювано 4 високовірулентних штами *F. tularensis* генотипів A5, A23. Водночас у хворих реєстрували гландулярну, ульцерогландулярну та генералізовану форми туляремії інфекції. Виявляли також атипів форми. В Сумській області в період підйому захворюваності (2011) виявлено новий унікальний генотип A4' (кліщі).

При проведенні детального вивчення штамів *F. tularensis* різних груп генотипів, що виявлені на фоні підйому захворюваності, встановлено циркуляцію

19 генотипів групи А в роки епідускладнень, з яких генотипи A5, A12, A16 були спільними для всіх трьох зон, але також визначені унікальні генотипи A22/5 (Степ), A4' (Полісся), A5/7 (Лісостеп) (табл. 2).

Таблиця 2. Генотипи штамів *F. tularensis holartica*, які виявлені в період підйому захворюваності в різних зонах України

Зона/область	Генотипи штамів, що виявлені в період підйому захворюваності	Вірулентні штами генотипів групи А, які зумовлювали <i>in vitro</i> найбільш важку цитодеструкцію інфікованих клітин ПКЛ
Степ/Одеська	A10, A11, A12, A13, A16, A21, A22/5 (1997-1998) A2'', A11', A16' (2017)	штам 106, A12 (заєць, 1998) штам 146, A22/5 (миша хатня, 1998) штам 341, A16' (миша лісова, 2017)
Полісся/Сумська	A1, A2, A4', A5, A12, A16, A17, A23, B16 (2005, 2011)	штами 348, 359 генотип A23 (люди, 2005) штам 150, генотип A4' (кліщі, 2011)
Полісся/Чернігівська	A5, A11, A12, A14, A20, B20' (1999)	штам 523, генотип A5 (солома, 1999)
Лісостеп/Львівська	A6, A8, A20, A23, B2', B11' (1999)	штам 529, генотип A8 (бурозубка, 2005)
Лісостеп/Полтавська	A7, A12, A16, A18 (1967, 1998/1999)	штами 41, генотипи A5/7 штам 29, генотип A16 (водяні щури, 1967)

При аналізі отриманих результатів встановлено, що найважчу цитодеструкцію інфікованих клітин ПКЛ та клітин паренхіматозних органів білих мишей зумовлювали штами, що циркулювали під час підйому захворюваності в різних зонах: Степ – штам 146 (A22/5), 106 (A12) – спалах туляремії (1998), 341 (A16') – епізоотії (2017); Полісся – штами 348, 359 (A23) – хворі люди (2005); Лісостеп – штами 29 (A16, 1967), 529 (A8, 2005) – епізоотії ссавців.

Виявлені тяжкі агресивні uszkodження клітин ПКЛ та клітин паренхіматозних органів білих мишей під дією вищезазначених штамів свідчать про те, що окремі патогени збудника туляремії підвиду *F. tularensis holartica* є надзвичайно вірулентними, які зумовили групові випадки в різних регіонах та спалахах туляремії в зоні Степу.

Туляремія відноситься до керованих інфекцій, при яких специфічна профілактика є однією з головних ланок в системі епідинагляду. Однак в Україні імунизация контингентів високого потенційного ризику зараження на активних ензоотичних територіях не проводиться. Відмічається також недостатній рівень та якість своєчасної, вірогідної діа-

гностики туляремії, особливо на фоні появи великої кількості атипичних форм інфекції. На сьогодні в країні вітчизняні препарати для діагностики туляремії та вакцини для її профілактики не виробляють. В минулому Одеський завод бактерійних та вірусних препаратів випускав ефективну високоімуногенну туляремійну вакцину та тулярин для контролю за станом імунітету населення. Але, на жаль, завод давно не працює.

Вважаємо, що необхідно активізувати дослідження з діагностики туляремії з впровадженням сучасних технологій та відновити виробництво вітчизняних профілактичних препаратів. Вищезазначені проблеми потребують свого вирішення.

Отже, багаторічні комплексні дослідження, що проведені на основі використання молекулярно-генетичного, еколого-епідеміологічного, епізоотологічного моніторингу дали можливість проаналізувати стан проблеми туляремії в Україні, визначити активність природних осередків в різних географічних зонах, охарактеризувати структуру популяції *F. tularensis holarctica* з виявленням високівірulentних геноваріантів збудника та оцінити їх значення в епіпроцесі інфекції.

Висновки. Молекулярно-генетичний моніторинг природних осередків туляремії є інформаційною базою системи епідагляду, який дозволяє ідентифікувати індивідуальні штами *F. tularensis* з визначенням їх генетичних особливостей та епідемічної значимості, що забезпечує своєчасну розшифровку спорадичних та групових випадків туляремії, призначення адекватної терапії та проведення раціональних протиепідемічних заходів.

Проведений ретроспективний молекулярно-генетичний аналіз значної колекції *F. tularensis holarctica* (222 штами) дав можливість ідентифікувати 48 генотипів (довгоперсистуючих, спільних, унікальних) різних груп (А, В, С) та визначити еколого-генетичні особливості структури популяції збудника туляремії в Україні. Розроблено генетичні паспорти індивідуальних штамів *F. tularensis holarctica* та карти-схеми їх територіального розповсюдження.

Представлено характеристику вірулентних властивостей генотипів груп А, В, С штамів *F. tularensis*, що ізольовані під час епідускладень та в міжепідемічні періоди, з визначенням їх більшої кількості, різноманіття та появи нових генотипів з високим епідпотенціалом на фоні підйому захворюваності. Найбільш високовірulentними та епідемічно значимими геноваріантами штамів *F. tularensis* були генотипи групи А. Визначення вірулентних властивостей регіональних штамів *F. tularensis* дає можливість встановити активність епізоотичних та епідемічних процесів в природних осередках туляремії та може служити критерієм оцінки їх епідпотенціалу.

На основі проведених досліджень визначено видовий склад носіїв та переносників збудника туляремії, екологічні фактори, які забезпечують циркуляцію та резервацію *F. tularensis* у природних осередках різного типу, створено раціональну систему паспортизації конкретних активних ензоотичних територій, що дає можливість прогнозувати

епідускладення та проводити раціональні протиепідемічні та профілактичні заходи.

Назріла необхідність активізації досліджень зі своєчасної та вірогідної діагностики туляремії з використанням сучасних молекулярно-генетичних технологій та організації виробництва вітчизняних діагностичних і профілактичних препаратів.

Впровадження молекулярно-генетичного моніторингу природних осередків, що має високу продуктивність та інформативність, в роботу закладів практичних органів охорони здоров'я та ветеринарної медицини сприятиме оптимізації раціональної системи епідагляду за туляремією та підвищенню рівня безпеки населення в Україні.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Дослідження проводились в період виконання наукових тем впродовж 2007 – 2019 років в Державній установі «Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечнікова Міністерства охорони здоров'я України» за бюджетні кошти із фінансуванням МОЗ України.

Література

1. Андрейчин М. А., Копча В. С. Медичні проблеми боротьби з біотероризмом. Сучасні інфекції; 2004; 1: 95–107.
2. Некрасова Л. С. Біобезпека: міжнародна та національна складові. СЕС Профілактична медицина 2011; 2: 2–3
3. 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; 48 (7): 863–870. doi: 10.1086/597261
4. Decors A., Lesage C., Jourdain E., Giraud P., Houbron P., Vanhem P., Madani N. Outbreak of tularaemia in brown hares (*Lepus europaeus*) in France, January to March 2011. Euro Surveill. 2011;16 (28): 19913.
5. Desvars A., Furberg M., Hjertqvist M., Vidman L., Sjöstedt A., Rydén P., Johansson A. Epidemiology and ecology of tularaemia in Sweden, 1984–2012. Emerg. Infect. Dis., 2015; 21(1): 32–39. doi: 10.3201/eid2101.140916
6. Maurin M., Gyuranecz M. Tularaemia: clinical aspects in Europe. Lancet Infect. Dis., 2016; 16 (1): 113–124. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00355-2
7. Wang Y., Peng Y., Hai R., Xia L., Li H., Zhang Z., Cai H., Liang Y., Shen X., Yu D., Birdsall D., Wagner D. M., Keim P. [Emerging Diversity of *Francisella tularensis* Subsp. *Holarctica* Lineages]. China Infectious Diseases. 2014; 20(7):1191–1194. Retrieved from <http://www.cdc.gov/eid>
8. Небогаткін І., Новохатній Ю., Видайко Н., Білонік О., Світа В. Туляремія в Україні, сучасний ландшафтно-географічний поділ осередків, транскордонний аспект. Ветеринарна медицина. 2017;103: 56–57. http://www.jvm.kharkov.ua/sbornik/103/1_13.pdf
9. Нехороших З. М., Джуртубаева Г. М., Пилипенко Н. В., Процишина Н. М., Пархоменко Н. Б., Видайко Н. Б., Ковбасюк О. В., Єгорова О. О. Генетична різноманітність штамів *F. tularensis*, що ізольовані в різних ландшафтно-географічних зонах України. Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу. Львів. 2015. вип.12. С. 51–53.
10. Nekhoroshikh Z. M., Dzhurtubayeva G. M., Protsyshyna N. M., Piliipenko N. V., Pozdnyakov S. V., Popova N. A., Egorova O. O. Surveillance in the Natural Foci of Especially Dangerous Infections Surveillance in Southern Ukraine ISDS: Annual Conference Proceedings. Online Journal of Public Health Informatics 2016; 8(1):128 <https://doi.org/10.5210/ojphi.v8i1.6564>
11. Герасименко Т. В., Могилевський Л. Я., Хабло З. А. Імунопрофілактика туляремії в сучасних умовах. Інфекційні хвороби, (4) 2013. С.59–62. <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2010.4.734>
12. Чемич М. Д., Малиш Н. Г., Ільїна Н. І., Ільїна В. В. Туляремія: сучасний погляд на проблему Журнал клінічних та експерим. мед. досліджень. 2018; 6(1): 148–161. <http://irbis-nbuv.gov.ua/publ/REF-0000685845>

Оригінальні дослідження

13. Патент UA №75546 на корисну модель Мультиплексна ПЛР тест-система для детекції збудника туляремії. Заявник: УНДПЧІ ім. І. І. Мечникова. Винахідники: Стопчанська А. Г., Джуртубаєва Г. М., Галаєв О. В., Пилипенко Н. В., Пархоменко Н. Б. № у 2012 04662. Заявл. 13.04.2012. опубл. 10.12.2012р., Бюл. №23
14. Нехороших З. М., Джуртубаєва Г. М., Галаєв О. В., Пилипенко Н. В., Процишина Н. М., Єгорова О. О., Видайко Н. Б., Загоруйко М. О. Розробка та апробація генодіагностичних ПЛР тест-систем для індикації та ідентифікації *Francisella tularensis*. Ветеринарна медицина. Харків. 2016; 102: 249–253.
15. Johansson A., Farlow J., Larsson P. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by Multiple-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *Bacteriol.* 2004; 186(17): 5808–5818. PMID: 15317786 PMCID: PMC516809 DOI: 10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004
16. Vogler A. J., Birdsell D., Wagner D. M. and Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Journal compilation a 2008 The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology.* 2009; 48: 140–144. PMID: 19018964 DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02484.x
17. Патент UA № 37715 на корисну модель. Спосіб визначення патогенності штамів *F. tularensis in vitro*. Заявник: УНДПЧІ ім. І. І. Мечникова. Винахідники: Стопчанська А. Г., Пархоменко Н. Б., Пилипенко Н. В., Джуртубаєва Г. М., Костюченко Л. С. Опубл. 10.12.2008 р., Бюл. №23.
18. Нехороших З. М., Процишина Н. М., Самойленко В. О., Маньковська Н. М., Загоруйко М. О., Бондаренко Д. А. Фактори активізації природних осередків зоонозних особливо небезпечних інфекцій на території півдня України. *Медицина невідкладних станів.* 2023; 9(3): 94–97.
19. Герасименко Т. В., Могілевський Л. Я., Хабло З. А. Районування території України за ступенем епідеміологічного ризику. Матеріали наукової конференції «Актуальні питання епіднагляду за особливо небезпечними інфекціями, санітарна охорона території, біологічна безпека». Іллічівськ. 2010, С. 39–41.



Відомості про авторів:

Нехороших З. М. — д. м. н., старший науковий співробітник лікар-бактеріолог лабораторії індикації збудників особливо небезпечних бактеріальних інфекцій. Аналіз отриманих результатів проведених експериментальних досліджень з вивчення генотипових, вірулентних властивостей штамів *F. tularensis holarctica* та моніторингу природних осередків туляремії. Написання статті, оформлення ілюстративного матеріалу, аналіз літературних джерел.

Процишина Н. М. — бактеріолог лабораторії індикації збудників особливо небезпечних бактеріальних інфекцій. Участь у виконанні експериментальних досліджень з вивчення вірулентності штамів *F. tularensis in vitro*, друкування статті та оформлення презентації (фото, діаграми, таблиці), пошук та аналіз літературних джерел.

Самойленко В. О. — в. о. завідувача лабораторії індикації збудників особливо небезпечних бактеріальних інфекцій, бактеріолог. Участь в експериментальних дослідженнях з вивчення вірулентності штамів *F. tularensis in vivo*. Ізоляція нових штамів *F. tularensis* та підтримка життєздатності музейних культур збудника туляремії, ПЛР-дослідження, пошук літературних джерел.

Маньковська Н. М. — бактеріолог лабораторії індикації збудників особливо небезпечних бактеріальних інфекцій. Участь в експериментальних дослідженнях з вивчення вірулентності штамів *F. tularensis in vivo*. Ізоляція нових штамів *F. tularensis* та підтримка життєздатності музейних культур збудника туляремії, ПЛР-дослідження, пошук літературних джерел.

Загоруйко М. О. — бактеріолог лабораторії індикації збудників особливо небезпечних бактеріальних інфекцій. Участь в експериментальних дослідженнях з вивчення вірулентності штамів *F. tularensis in vivo*. Ізоляція нових штамів *F. tularensis* та підтримка життєздатності музейних культур збудника туляремії, ПЛР-дослідження, проведення генотипування регіональних штамів, пошук літературних джерел.

Бондаренко Д. А. — директор Філії «Протичумний інститут імені І. І. Мечникова» Державної установи «Центр громадського здоров'я МОЗ України». Участь в аналізі результатів з виконання розділу еколого-епізоотологічних досліджень, пошук та аналіз літературних джерел.

Information about the authors:

Nekhoroshykh Z. M. — PhD, Doctor of Medicine, senior researcher, bacteriologist of the laboratory for the indication of pathogens of particularly dangerous bacterial infections.

Protsyshyna N. M. — bacteriologist of the laboratory for the indication of pathogens of particularly dangerous bacterial infections.

Samoilenko V. O. — acting head of the laboratory for the indication of pathogens of particularly dangerous bacterial infections, bacteriologist.

Mankovska N. M. — bacteriologist of the laboratory for the indication of pathogens of particularly dangerous bacterial infections.

Zagoruyko M. O. — bacteriologist of the laboratory for the indication of pathogens of particularly dangerous bacterial infections.

Bondarenko D. A. — director of the Branch "The I. I. Mechnykov Anti-Plague Institute" of the SI "Public Health Center of the Ministry of Health of Ukraine".