

DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-152-157

УДК 579.841.95:579

В.М. Павлов, Г.М. Вахрамеева, М.Е. Платонов, А.Н. Мокриевич, Т.И. Комбарова,
Р.И. Миронова, М.А. Сотникова, В.И. Соломенцев, И.А. Дятлов

Создание и свойства штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ без гена *sodC*

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Российская Федерация

Цель исследования – создание и изучение иммуногенных свойств штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ без гена *sodC*, кодирующего CuZn-зависимую супероксиддисмутазу. **Материалы и методы.** Делецию гена *sodC* из хромосомы туляремийного микроба проводили методом аллельного обмена с использованием суицидного плазмидного вектора pGM5. Модифицированный фрагмент хромосомы без структурной части гена *sodC* создавали объединением ампликонов, синтезированных методом ПЦР с помощью двух пар праймеров. Для переноса плазмид в бактерии *Escherichia coli* и *F. tularensis* использовали метод электропорации. Для иммунизации и заражения использовали мышей линии BALB/c. Для оценки реактогенности штаммов для мышей определяли средний вес животных в группах. **Результаты и обсуждение.** Методом аллельного обмена создан штамм *F. tularensis* 15Δ*sodC*, в хромосоме которого отсутствовал фрагмент размером 545 п.о. со структурной частью гена *sodC*. Данный штамм не отличался по вирулентности и реактогенности от исходного штамма 15 НИИЭГ, но мыши, иммунизированные делетированным вариантом вакцинного штамма, легче перенесли экспериментальную инфекцию, вызванную природным штаммом *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-678. Сделано предположение, что удаление гена *sodC* может улучшить иммуногенные свойства штамма туляремийного микроба при целенаправленном конструировании перспективного кандидата для создания современной туляремийной вакцины со сниженной реактогенностью.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, вакцинный штамм, ген *sodC*, делеция, аллельный обмен.

Корреспондирующий автор: Мокриевич Александр Николаевич, e-mail: mokrievich@obolensk.org.

Для цитирования: Павлов В.М., Вахрамеева Г.М., Платонов М.Е., Мокриевич А.Н., Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Сотникова М.А., Соломенцев В.И., Дятлов И.А. Создание и свойства штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ без гена *sodC*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2026; 1:152–157. DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-152-157

Поступила 28.04.2025. Отправлена на доработку 03.10.2025. Принята к публикации 10.12.2025.

V.M. Pavlov, G.M. Vakhrameeva, M.E. Platonov, A.N. Mokrievich, T.I. Kombarova,
R.I. Mironova, M.A. Sotnikova, V.I. Solomentsev, I.A. Dyatlov

Design and Properties of the *Francisella tularensis* Strain 15 NIEG without the *sodC* Gene

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to create and study the immunogenic properties of *Francisella tularensis* strain 15 NIEG without the *sodC* gene encoding CuZn-dependent superoxide dismutase. **Materials and methods.** Deletion of the *sodC* gene from the chromosome of the tularemia microbe was performed applying the allelic exchange method using the suicide plasmid vector pGM5. The modified chromosome fragment without the structural part of the *sodC* gene was constructed by combining amplicons synthesized via PCR using two pairs of primers. Electroporation was used to transfer plasmids into *Escherichia coli* and *F. tularensis* bacteria. BALB/c mice were used for immunization and infection. To assess the reactogenicity of the strains for mice, the average weight of animals in groups was determined. **Results and discussion.** The allelic exchange method was used to create the *F. tularensis* 15Δ*sodC* strain, in the chromosome of which a 545 bp fragment with the structural part of the *sodC* gene was missing. This strain did not differ in virulence and reactogenicity from the original strain 15 NIEG, but mice immunized with the deleted version of the vaccine strain more easily tolerated the experimental infection caused by the natural strain *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-678. It has been suggested that deletion of the *sodC* gene may improve the immunogenic properties of the tularemia microbe strain in the targeted design of a promising candidate for the creation of a modern tularemia vaccine with reduced reactogenicity.

Key words: *Francisella tularensis*, vaccine strain, *sodC* gene, deletion, allelic exchange.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The study was carried out within the framework of the sectoral program of the Rospotrebnadzor.

Bioethics: Keeping of animals and manipulations with them were carried out in a vivarium that complied with the requirements of GAC (Good Animal Care) and the protocol No. P03-20 of the Bioethics Committee of the State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Rospotrebnadzor.

Corresponding author: Alexander N. Mokrievich, e-mail: mokrievich@obolensk.org.

Citation: Pavlov V.M., Vakhrameeva G.M., Platonov M.E., Mokrievich A.N., Kombarova T.I., Mironova R.I., Sotnikova M.A., Solomentsev V.I., Dyatlov I.A. Design and Properties of the *Francisella tularensis* Strain 15 NIEG without the *sodC* Gene. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2026; 1:152–157. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-152-157

Received 28.04.2025. Revised 03.10.2025. Accepted 10.12.2025.

Pavlov V.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9107-5304>
Vakhrameeva G.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1891-0283>
Platonov M.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3946-1755>
Mokrievich A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3675-8780>
Kombarova T.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1959-1739>

Mironova R.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8318-4156>
Sotnikova M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3899-4277>
Solomentsev V.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8378-5389>
Dyatlov I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1078-4585>

В настоящее время для профилактики туляремии в Российской Федерации используют живую туляремийную вакцину, созданную на основе штамма *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 15 линии НИИЭГ [1]. Коммерческая туляремийная вакцина, несмотря на высокую эффективность, вызывает у 6–10 % привакцинированных людей нежелательные реакции транзиторного характера в виде лимфаденитов, повышения температуры, недомогания и появления послепрививочных эритем [2, 3]. Поэтому проблема целенаправленной генетической аттенуации вакцинного штамма для снижения его реактогенности при сохранении и улучшении иммуногенности является актуальной, позволяющей расширить охват прививаемого контингента населения, в частности людей с ослабленным иммунитетом и детей [3].

У возбудителя туляремии, как и у большинства бактериальных патогенов, в геноме присутствует ген *sodC*, кодирующий периплазматическую CuZn-содержащую супероксиддисмутазу (SodC), которая является компонентом системы защиты патогена от супероксидных радикалов (O_2^-), вырабатываемых макроорганизмом [4]. По литературным данным, делеция гена *sodC* в хромосоме штамма *F. tularensis* LVS приводит к снижению скорости размножения модифицированного варианта в макрофагах и уровня транзиторной обсемененности органов инфицированных мышей [5]. Однако при оценке протективных свойств модифицированного варианта штамма LVS без гена *sodC* лабораторных мышей заражали не природным штаммом *F. tularensis*, а слабовирулентным вакцинным штаммом LVS [5].

Цель исследования – создание и изучение иммуногенных свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ без гена *sodC*, кодирующего CuZn-зависимую супероксиддисмутазу. В работе приведены результаты по созданию делеционного варианта штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ без гена *sodC* и данные о влиянии отсутствия CuZn-содержащей супероксиддисмутазы в бактериях на транзиторное снижение веса мышей линии BALB/c после иммунизации, а также на протективные свойства модифицированного штамма по сравнению со штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ при заражении иммунных мышей природным вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы, плазмиды и праймеры, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Штаммы *Escherichia coli* выращивали на плотной и в жидкой питательной среде Лурия – Бергана при температуре 37 °С [9], при необходимости в среды добавляли антибиотики (100 мкг/мл ампициллина или 20 мкг/мл хлорамфеникола). Штаммы *F. tularensis* выращивали на FT-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и в жидкой питательной среде (ЖПС) [10] при температуре 37 °С.

При необходимости в среды добавляли 100 мкг/мл полимиксина В, 3 мкг/мл хлорамфеникола и 5 % сахарозы. Для определения времени удвоения оптической плотности культур на длине волны 595 нм в 10 мл ЖПС, внесенные в колбу объемом 100 мл, заседали 1 мл бактериальной суспензии, приготовленной по стандарту мутности ОСО 42-28-85-2012 (ФГБУ НЦЭСМП, Россия) из ночной агаровой культуры. Образцы для измерения оптической плотности отбирали через 2, 4 и 6 ч инкубирования на качалке при встряхивании с частотой 180 об/мин.

Генно-инженерные операции с клетками *E. coli* проводили по методикам, изложенным в [11]. Для переноса плазмидной ДНК в бактерии *F. tularensis* использовали метод электропорации бактерий [12]. Праймеры конструировали на основе нуклеотидной последовательности генома *F. tularensis* ssp. *holarctica* LVS (Gen Bank NCBI, NC_007880.1). Для амплификации целевых фрагментов ДНК *F. tularensis* в качестве матрицы использовали термоинактивированный бактериальный лизат клеток *F. tularensis* в концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл. Для приготовления ДНК-библиотек культур исследуемого штамма использовали набор MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (Wuhan MGI Tech Co., Ltd, КНР) в соответствии с рекомендациями производителя. Фрагментацию молекул ДНК осуществляли в системе ультразвуковой фрагментации BioRuptor (Diagenode, США). Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе MGISEQ-2000RS с использованием набора для секвенирования MGISEQ-2000 PE150 High-throughput Sequencing Set (Wuhan MGI Tech Co., Ltd, КНР) в соответствии с рекомендациями производителя.

На первом этапе были получены ампликоны с фрагментами генома *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после гена *sodC*, с помощью пар праймеров SodCL-F/SodCL-R и SodCR-F/SodCR-R (ООО «Синтол», Россия). Полученные ампликоны обрабатывали рестриктазами SalI/VamHI (правое плечо) и SalI/BglII (левое плечо), объединяли и встраивали в SalI-сайт плазмиды pGM5 с помощью ДНК-лигазы. Созданная рекомбинантная плаزمиды была перенесена в клетки штамма *E. coli* DH5 α методом электропорации [13]. Трансформанты с целевой плазмидой отбирали по фенотипу Ap^RCm^RXgal⁻ с последующим ПЦР-анализом ДНК клонов с использованием пары праймеров SodCL-F/SodCR-R. В результате был отобран клон с плазмидой pGM Δ sodC, содержащей фрагмент генома *F. tularensis* без структурной части гена *sodC*. Для встраивания суицидной плазмиды pGM Δ sodC в хромосому *F. tularensis* плазмиду трансформировали методом электропорации в клетки вакцинного штамма туляремийного микроба. Клоны с интегрированной плазмидой pGM Δ sodC отбирали на среде FT-агар, содержащей 10 мкг/мл хлорамфеникола и 100 мкг/мл полимиксина В. Методом ПЦР с праймерами SodCL-F/SodCR-R подтвердили наличие в ДНК отобранного клона двух копий участка хромосомы с геном *sodC* и без данного гена. Для удале-

Таблица 1 / Table 1

Бактериальные штаммы, плазмиды и праймеры
Bacterial strains, plasmids and primers

Название Name	Характеристика Feature	Источник или ссылка Source or link
Штаммы / Strains		
<i>F. tularensis</i> 15 линии НИИЭГ <i>F. tularensis</i> 15 НИЭГ	subsp. <i>holarctica</i> , вакцинный / vaccine	«ГКПМ-Оболенск»* “SCPM-Obolensk”**
<i>F. tularensis</i> 15ΔsodC	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ с делетированным геном <i>sodC</i> <i>F. tularensis</i> 15 НИЭГ with deleted <i>sodC</i> gene	Данная работа Current work
<i>F. tularensis</i> A-678	subsp. <i>mediasiatica</i> , природный штамм, выделенный из клещей в Алтайском крае в 2011 г. subsp. <i>mediasiatica</i> , natural strain isolated from ticks in the Altai Territory in 2011	«ГКПМ-Оболенск» “SCPM-Obolensk” [6]
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F</i> ⁻ (<i>φ80dlacZAM15</i>) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169</i>	«ГКПМ-Оболенск» “SCPM-Obolensk” [7]
Плазмиды / Plasmids		
pGM5	Amp ^R , Cm ^R , <i>sacB</i>	[8]
pGMΔsodC	Amp ^R , Cm ^R , <i>sacB</i> , фрагмент ДНК <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ, 1,69 т.п.о. с делецией 530 п.о. в структурной части гена <i>sodC</i> Amp ^R , Cm ^R , <i>sacB</i> , DNA fragment of <i>F. tularensis</i> 15 НИЭГ, 1.69 kbp with a deletion of 530 bp in the structural part of the <i>sodC</i> gene	Данная работа Current work
Праймеры / Primers		
Для амплификации участка генома, расположенного до гена <i>sodC</i> («левое плечо») To amplify the region of the genome located before the <i>sodC</i> gene (“left shoulder”)		
SodCL-F	5'-AAAGTCGACAACGACAGCATATTGCCACTCATAG-3'	Данная работа Current work
SodCL-R	5'-AAAGGATCCCACCTCCAAAATTTAGGTCATATC-3'	
Для амплификации участка генома, расположенного после гена <i>sodC</i> («правое плечо») To amplify the region of the genome located after the <i>sodC</i> gene (“right shoulder”)		
SodCR-F	5'-AAAAGATCTGTGCTAGAATGTGGTGTGGAGTTA-3'	Данная работа Current work
SodCR-R	5'-AAAGTCGACCATATCAATATGACCTTCTTTGGC-3'	
Для амплификации гена <i>sodC</i> For amplification of the <i>sodC</i> gene		
sodC-KF	5'-CGTATCAGCTAAAGTGATAATCGGT-3	Данная работа Current work
sodC-KR	5'-GACAAAATACTGCAACACCAACAGC-3	
Для амплификации гена <i>cat</i> плазмиды pC194 For amplification of the <i>cat</i> gene of the plasmid pC194		
CCF	5'-ACAATTGGAAGAGAAAAGA-3'	[8]
CCR	5'-CTATCTGACAATTCCTGA-3'	

Примечание: * «ГКПМ-Оболенск» – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур на базе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора.

Note: * “SCPM-Obolensk” – State Collection of Pathogenic Microorganisms and Cell Cultures at the Federal Budgetary Scientific Institution “State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology” of the Rosпотребнадзора.

ния одной копии этого участка в результате гомологичной рекомбинации культуру клона выращивали на FT-агаре в течение 22 ч при температуре 37 °С, а затем рассеивали до изолированных колоний на FT-агар с 100 мкг/мл полимиксина В и 5 % сахарозы. Клоны с фенотипом *Suc*⁻ отбирали через 72 ч инкубации и затем их проверяли на фенотип *Suc*^S. На заключительном этапе аллельного обмена среди клонов с фенотипом *Suc*^S*Suc*⁻ методом ПЦР с использованием контрольных праймеров *sodC*-KF/*sodC*-KR выявляли клоны, в хромосоме которых отсутствовала структурная часть гена *sodC*. Для дополнительного

контроля отсутствия гена *cat* в сконструированном штамме *F. tularensis* 15ΔsodC использовали метод ПЦР с парой праймеров CCF/CCR.

В работе использовали инбредных мышей линии BALB/c обоего пола в возрасте 6–8 недель и весом 18–20 г (питомник «Пушино», Филиал института биоорганической химии РАН, г. Пушино, Московская обл., Россия). Содержание животных и манипуляции с ними выполняли в виварии, соответствующем требованиям GAC (Good Animal Care [14]) и протоколу № P03-20 комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора.

В паховую область животным вводили подкожно 0,2 мл бактериальной суспензии, используя иглу 23G. Наблюдение за животными вели в течение 30 суток. Для определения веса групп мышей использовали весы с точностью измерения 0,1 г.

Определение DCL₁₀₀ и LD₅₀ штаммов *F. tularensis* проводили по общепринятым методикам.

Иммунным группам мышей подкожно вводили 0,2 мл суспензии тест-заражающего штамма *F. tularensis* А-678 в дозе 5 · 10³ КОЕ (1000 Dcl). За состоянием животных наблюдали в течение 21 суток.

Для статистической обработки результатов использовали программу Excel. Величины LD₅₀ определяли по методу Г. Кербера (G. Kerber) в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [15].

Результаты и обсуждение

Для исследования роли гена *sodC* штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в реактогенности и протективности живой туляремийной вакцины был создан делеционный вариант вакцинного штамма без гена *sodC* методом аллельного обмена. Суицидная плазмида рGMΔ*sodC*, содержащая фрагмент ДНК хромосомы с делетированной структурной частью гена *sodC*, была создана на основе суицидного вектора рGM5. Делеционный фрагмент генома *F. tularensis* без структурной части гена *sodC* размером 545 п.о. был синтезирован в результате объединения двух ампликонов размером 940 п.о. (5'-левое плечо) и 746 п.о. (3'-правое плечо), полученных при использовании праймеров SodCL-F/SodCL-R и SodCR-F/SodCR-R, фланкирующих участки, примыкающие к гену *sodC* (рисунок).

В результате замены нативного фрагмента ДНК в области гена *sodC* на модифицированный без структурной части гена *sodC* в штамме *F. tularensis* 15 НИИЭГ получен штамм *F. tularensis* 15Δ*sodC*. Анализ нуклеотидной последовательности генома *F. tularensis* 15Δ*sodC* в районе гена *sodC* подтвердил отсутствие структурной части гена *sodC*.

Созданный штамм *F. tularensis* 15Δ*sodC* по вирулентности для мышей линии BALB/c при внутрикожном заражении достоверно не отличался от штамма 15 НИИЭГ, LD₅₀ которого составляла (1016±200) КОЕ. Одной из характеристик реактогенности вакцинного штамма является степень транзитного снижения

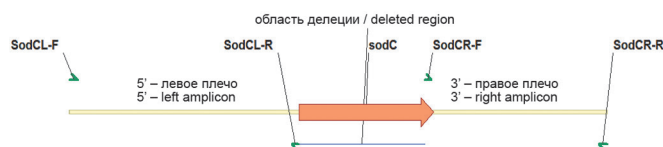


Схема участка хромосомы *F. tularensis* 15 НИИЭГ в области гена *sodC*. Стрелками указано расположение праймеров, использованных для получения ампликонов с левым и правым плечами, примыкающими к структурной части гена *sodC*

Scheme of the *F. tularensis* 15 NIEG chromosome region in the *sodC* gene area. Arrows indicate the location of the primers used to obtain the left and right amplicons adjacent to the structural part of the *sodC* gene

Таблица 2 / Table 2

Динамика изменения среднего веса мышей линии BALBc после иммунизации штаммами *F. tularensis* 15Δ*sodC* и 15 НИИЭГ дозой 1 · 10² КОЕ

Dynamics of changes in the average weight of BALBc mice after immunization with *F. tularensis* strains 15Δ*sodC* and 15 NIEG at a dose of 1 · 10² CFU

Группа мышей, иммунизированных штаммом <i>F. tularensis</i> A group of mice immunized with <i>F. tularensis</i> strain	Сутки / Относительный вес Day / Relative weight				
	0	4	7	14	21
15Δ <i>sodC</i>	1	0,95	0,92	1,00	1,00
15 НИИЭГ / 15 NIEG	1	0,96	0,92	0,96	1,00
Интактные / Intact	1	1,02	1,07	1,15	1,24

веса экспериментальных животных после иммунизации. В табл. 2 приведены данные относительного снижения среднего веса мышей в экспериментальной и контрольной группе (по 5 животных в группе) до 21-го дня наблюдения. Мыши, иммунизированные штаммом 15Δ*sodC*, на 4-е сутки снизили вес на 5 %, это снижение практически не отличалось от падения веса у группы сравнения, иммунизированной штаммом 15 НИИЭГ (4 %). Данная тенденция сохранилась и к 7-му дню наблюдения: снижение веса составило 8 % в обоих случаях. К 14-му дню средний вес в группе животных, иммунизированных штаммом 15Δ*sodC*, достиг исходного значения, тогда как в группе сравнения вес достиг 96 % от исходного. К 21-му дню веса в обеих группах достигли исходных значений, тогда как в группе интактных мышей вес превысил исходный на 24 %.

Для оценки уровня защиты экспериментальных мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15Δ*sodC*, от заражения природным штаммом в данной работе был использован вирулентный штамм *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* А-678, DCL которого для мышей составлял менее 10 КОЕ. Экспериментальную группу и группу сравнения иммунных животных заражали подкожно дозой 5 · 10³ КОЕ/мышь. В обеих группах мышей в течение всего периода наблюдения (30 сут) гибель животных отсутствовала. Одной из характеристик тяжести инфекционного процесса в зараженном организме, помимо гибели и среднего срока жизни животных, является транзитная потеря веса у инфицированных животных. В табл. 3

Таблица 3 / Table 3

Динамика изменения среднего веса иммунных мышей линии BALBc после заражения штаммом *F. tularensis* А-678 дозой 5 · 10³ КОЕ

Dynamics of changes in the average weight of immune BALBc mice after infection with *F. tularensis* А-678 strain at a dose of 5 · 10³ CFU

Группа мышей, иммунизированных штаммом <i>F. tularensis</i> A group of mice immunized with <i>F. tularensis</i> strain	Сутки / Относительный вес Day / Relative weight			
	0	4	7	14
15Δ <i>sodC</i>	1	0,99	0,94	1,05
15 НИИЭГ / 15 NIEG	1	0,90	0,90	0,97

приведены данные относительного снижения среднего веса мышей в экспериментальной группе и группе сравнения. Мыши, иммунизированные штаммом 15 Δ sodC, после заражения вирулентным штаммом на 4-е сутки практически не среагировали на введение патогенной культуры – снижение веса составило не более 1 %, тогда как заражение группы мышей, иммунизированных штаммом 15 НИИЭГ, привело к снижению веса животных на 10 %. К 7-му дню наблюдения в экспериментальной группе ускорилось снижение веса до 6 % от исходного, тогда как в группе сравнения средний вес мышей не изменился. К 14-му дню средний вес в группе животных, иммунизированных штаммом 15 Δ sodC, превысил исходный на 5 %, а в группе сравнения не достиг исходного значения.

В данной работе подтверждена эффективность использования суицидной плазмиды rGM5 для проведения аллельного обмена в геноме туляремийного микроба [8]. Созданный модифицированный вариант штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ без гена *sodC* позволил приступить к изучению роли кодируемой данным геном CuZn-зависимой супероксиддисмутазы в метаболизме микроба. Делеция структурной части гена *sodC* в хромосоме туляремийного микроба не изменила микробиологические свойства модифицированного штамма по сравнению с исходным штаммом. Так, время удвоения оптической плотности клеток *F. tularensis* 15 Δ sodC в жидкой питательной среде составляло 2 ч, что практически не отличалось от вакцинного штамма 15 НИИЭГ, и время появления видимых колоний на FT-агаре в обоих случаях составляло 48 ч. Полученные результаты указывают на второстепенную роль фермента SodC в метаболизме туляремийного микроба *in vitro* и *in vivo*, в отличие от железозависимой супероксиддисмутазы, кодируемой геном *sodB*, жизненно необходимой для размножения *F. tularensis* [16].

Сравнение транзитного снижения веса мышей после иммунизации бактериями *F. tularensis* 15 Δ sodC и 15 НИИЭГ не выявило влияния продукта гена *sodC* на экспериментальных мышей. Хотя по литературным данным модифицированный штамм *F. tularensis* без гена *sodC*, созданный на основе штамма LVS, обладал сниженной способностью к размножению в мышинных макрофагах [5]. Однако реакция на заражение вирулентным штаммом была менее выраженной у группы мышей, иммунизированных бактериями *F. tularensis* 15 Δ sodC, чем у группы мышей, иммунизированных штаммом 15 НИИЭГ. Данное наблюдение, вероятно, указывает на персистенцию модифицированного штамма в органах иммунной системы и на преобладание вакцинального процесса над воспалительным в случае штамма 15 Δ sodC. Проверка данного предположения является предметом последующих исследований. Возможно, удаление гена *sodC* из хромосомы позволит улучшить иммуногенные свойства штамма туляремийного микроба при целенаправленном конструировании перспективного кандидатного штамма для создания

современной туляремийной вакцины со сниженной реактогенностью.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Биоэтика. Содержание животных и манипуляции с ними выполняли в виварии, соответствующем требованиям GAC (Good Animal Care) и протоколу № P03-20 комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора.

Список литературы

- Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 192 с.
- Соколов М.И., редактор. Профилактика инфекций живыми вакцинами. М.: Медгиз; 1960. С. 356.
- Медуницын Н.В. Вакцинология. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Триада-Х; 2010. 512 с.
- Larsson P., Oyston P.C.F., Chain P., Chu M.C., Duffield M., Fuxelius H.-H., Garcia E., Hålltorp G., Johansson D., Isherwood K.E., Karp P.D., Larsson E., Liu Y., Michell S., Prior J., Prior R., Malfatti S., Sjöstedt A., Svensson K., Thompson N., Vergez L., Wagg J.K., Wren B.W., Lindler L.E., Andersson S.G.E., Forsman M., Titball R.W. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat. Genet.* 2005; 37(2):153–9. DOI: 10.1038/ng1499.
- Melillo A.A., Mahawar M., Sellati T.J., Malik M., Metzger D.W., Melendez J.A., Bakshi C.S. Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *J. Bacteriol.* 2009; 191(20):6447–56. DOI: 10.1128/JB.00534-09.
- 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):66–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-66-69.
- Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., Graham M.W. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(9):3469–78. DOI: 10.1093/nar/17.9.3469.
- Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Павлов В.М. Получение и свойства вакцинного штамма туляремийного микроба без одной копии гена *iglC* и без гена *recA*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2015; (3):33–9.
- Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир; 1976. 440 с.
- 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):66–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-4(102)-66-67.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 480 с.
- Шишкова Н.А., Вахрамеева Г.М., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А. Плазмидная криотрансформация вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ. *Бактериология.* 2018; 3(2):38–42. DOI: 10.20953/2307-6631-2018-2-38-42.
- Lessard J.C. Transformation of *E. coli* via electroporation. *Methods Enzymol.* 2013; 529:321–7. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00027-6.
- National Research Council of the National Academies. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington (D.C.): National Academy Press; 2011. 220 p. DOI: 10.17226/12910.
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. С. 85–104.
- Bakshi C.S., Malik M., Regan K., Melendez J.A., Metzger D.W., Pavlov V.M., Sellati T.J. Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensi-

tivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J. Bacteriol.* 2006; 188(17):6443–8. DOI: 10.1128/JB.00266-06.

References

1. Olsuf'ev N.G. [Taxonomy, Microbiology and Laboratory Diagnosis of the Causative Agent of Tularemia]. Moscow: "Meditsina"; 1975. 192 p.
2. Sokolov M.I., editor. [Prevention of Infections by Live Vaccines]. Moscow: "Medgiz"; 1960. P. 356.
3. Medunitsyn N.V. [Vaccinology]. 3rd ed., revised and updated. Moscow: "Triada-X"; 2010. 512 p.
4. Larsson P., Oyston P.C.F., Chain P., Chu M.C., Duffield M., Fuxelius H.-H., Garcia E., Hälltorp G., Johansson D., Isherwood K.E., Karp P.D., Larsson E., Liu Y., Michell S., Prior J., Prior R., Malfatti S., Sjöstedt A., Svensson K., Thompson N., Vergez L., Wagg J.K., Wren B.W., Lindler L.E., Andersson S.G.E., Forsman M., Titball R.W. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat. Genet.* 2005; 37(2):153–9. DOI: 10.1038/ng1499.
5. Melillo A.A., Mahawar M., Sellati T.J., Malik M., Metzger D.W., Melendez J.A., Bakshi C.S. Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *J. Bacteriol.* 2009; 191(20):6447–56. DOI: 10.1128/JB.00534-09.
6. 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 Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (1):66–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-66-69.
7. Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., Graham M.W. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(9):3469–78. DOI: 10.1093/nar/17.9.3469.
8. Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Mironova R.I., Kombarova T.I., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. [Constriction and properties of the *Francisella tularensis* vaccine strain without one copy of *iglC* gene and without *recA* gene]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology, and Virology]*. 2015; (3):33–9.
9. Miller D. [Experiments in Molecular Genetics]. Moscow: "Mir"; 1976. 440 p.
10. 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 Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2009; (4):66–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-4(102)-66-67.
11. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. [Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning]. Moscow: "Mir"; 1984. 480 p.
12. Shishkova N.A., Vakhrameeva G.M., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Dyatlov I.A. [Plasmid cryo-transformation of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2018; 3(2):38–42. DOI: 10.20953/2307-6631-2018-2-38-42.
13. Lessard J.C. Transformation of *E. coli* via electroporation. *Methods Enzymol.* 2013; 529:321–7. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00027-6.
14. National Research Council of the National Academies. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington (D.C.): National Academy Press; 2011. 220 p. DOI: 10.17226/12910.
15. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Research]. Leningrad: "Medgiz"; 1962. P. 85–104.
16. Bakshi C.S., Malik M., Regan K., Melendez J.A., Metzger D.W., Pavlov V.M., Sellati T.J. Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J. Bacteriol.* 2006; 188(17):6443–8. DOI: 10.1128/JB.00266-06.

Authors:

Pavlov V.M., Vakhrameeva G.M., Platonov M.E., Mokrievich A.N., Kombarova T.I., Mironova R.I., Sotnikova M.A., Solomentsev V.I., Dyatlov I.A. State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology. 24, "Block A" Territory, Obolensk, urban district Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Павлов В.М., Вахрамеева Г.М., Платонов М.Е., Мокриевич А.Н., Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Сотникова М.А., Соломенцев В.И., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24. E-mail: info@obolensk.org.