

საქართველოში გავრცელებული *Francisella tularensis*
მოლეკულურ-ეპიდემიოლოგიური დახასიათება

გვანცა ჭანტურია

სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
მეცნიერებათა და ხელოვნების ფაკულტეტზე სიცოცხლის შემსწავლელ
მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნების
შესაბამისად

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:
რევაზ სოლომონია, პროფ. ბმდ,
მერაბ კეკელიძე ბმდ.

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისი, 2013

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
მეცნიერებათა და ხელოვნების ფაკულტეტის
დეკანს, პროფ. ლელა ხომერიკს

ამავე ფაკულტეტის დოქტორანტის
გვანცა ჭანტურიას

განაცხადი

ვაცხადებ, რომ წარმოდგენილი დისერტაცია „საქართველოში გავრცელებული *Francisella tularensis* მოლეკულურ-ეპიდემიოლოგიური დახასიათება“ ჩემი დამოუკიდებელი კვლევის შედეგია და იგი არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს.

გვანცა ჭანტურია

თბილისი, 10 იანვარი, 2013 წ.

მადლობა



- NAU - ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტი, მიკრობული გენეტიკისა და გენომიკის ლაბორატორია, არიზონა, აშშ, დოქტორი პოლ კეიმი, დოქტორი დონ ბერდსელი, დოქტორი ჯეისონ ფარლოუ, ერთობლივ სამუშაოში შეტანილი წვლილისა და გაწეული ფინანსური დახმარებისათვის



- WRAIR - ვოლტერ რიდის სამხედრო კვლევითი ინსტიტუტი, მერილენდი, აშშ, დოქტორი მაიკლჯონ ნიკოლიჩი, ერთობლივ სამუშაოში შეტანილი წვლილისა და გაწეული ფინანსური დახმარებისათვის



- DTRA - აშშ საფრთხის შემცირების სააგენტო, გაწეული ფინანსური დახმარებისათვის



- ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი, პროფესორი რევაზ სოლომონია



- დკსჯეც - ლ. საყვარელიძის სახელობის დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრი, დოქტორი მერაბ კეკელიძე, პროფესორი პაატა იმნაძე, დოქტორი იოსებ ველიჯანაშვილი

სარჩევი	
განაცხადი	2
მადლობა	3
ილუსტრაციების ჩამონათვალი	7
ცხრილების ჩამონათვალი.....	9
გამოყენებული ტერმინოლოგია.....	11
შესავალი	12
ლიტერატურული მიმოხილვა	14
ისტორიული ექსკურსი.....	14
მიკრობის ზოგადი დახასიათება	16
კლასიფიკაცია.....	19
ეპიდემიოლოგია	21
ვექტორები - ფეხსახსრიანები	22
ვექტორები - ძუძუმწოვრები.....	23
ტულარემიის სეზონურობა	25
მიკრობის დიაგნოსტიკა და გენოტიპირება.....	27
პრობლემის აქტუალობა	42
ტულარემია საქართველოში	42
კვლევის მიზანი	55
კვლევის მეთოდები.....	59
შემოსული ნიმუშების პირველადი დამუშავება.....	59
სეროლოგიური დიაგნოსტიკა.....	60
აგლუტინაცია სინჯარაში	60

აგლუტინაცია სასაგნე მინაზე.....	60
მოლეკულური დიაგნოსტიკა.....	60
დნმ-ის ექსტრაქცია	60
პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში - real-time PCR	61
მოლეკულური ტიპირება	62
გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში – Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)	62
მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი – MLVA-25.....	64
მულტიპლექსური MLVA - რამოდენიმე მარკერის ამპლიფიკაცია ერთ რეაქციაში	68
მულტიპლექსური MLVA-11 სისტემა	69
ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (Single Nucleotide Polymorphism (SNP)):	70
გენომური დნმ-ის ექსტრაქცია	75
სრული გენომის სექვენირება	77
მიღებული შედეგები.....	78
დიაგნოსტიკა	79
გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში – (PFGE)	80
მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი – MLVA	82
MLVA-25	82
მულტიპლექსური VNTR ანალიზის სისტემა.....	85
MLVA-11	88
ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი - SNP	88
შედეგების ინტერპრეტაცია	101

დასკვნები.....	107
Summary.....	109
Introduction.....	109
Aim of the study	111
Methods.....	111
Results & Discussions	111
PFGE.....	111
MLVA	112
SNP	113
Conclusions.....	114
პუბლიკაციები.....	115
სტატიები	115
პოსტერები.....	115
გამოყენებული ლიტერატურა:	116

ილუსტრაციების ჩამონათვალი

სურათი 1. ედუარდ ფრანცისი და ჰაჩირო ოჰარა	14
სურათი 2. <i>F. tularensis</i> რეპლიკაცია მაკროფაგში	17
სურათი 3. ევროპული კურდღლებისა და ჩვეულებრივი მემინდვრების პოპულაციების სიმჭიდროვე, კურდღლებში <i>F. tularensis</i> სპეციფიკური სეროპრევალირება და ადამიანებში ტულარემიის შემთხვევების რაოდენობა	24
სურათი 4. ტულარემიის სეზონურობის ცვლილება აშშ-ში 1930-2000 წლებში	26
სურათი 5. მსოფლიოში გავრცელებული <i>F. tularensis</i> შტამების MLVA-25 ტიპირების შედეგად მიღებული ფილოგენეტიკური ხე.	32
სურათი 6. 1655 SNP ლოკუსით დიზაინირებული მიკროჩიპებით ტიპირებული 95 შტამის შედარებით აგებული <i>F. tularensis</i> ფილოგენეტიკური ხე.	36
სურათი 7. INDEL და SNP მარკერებით ტიპირებული შტამების შედარებით აგებული <i>F. tularensis</i> ფილოგენეტიკური ხე	37
სურათი 8. SNP, MLVA და SNR მეთოდების შედარება <i>B. anthracis</i> შტამების მაგალითზე	38
სურათი 9. კასპის რაიონის სოფ. რენეში ტულარემიის აფეთქების ფოტომასალა.....	44
სურათი 10. ტულარემიის სავარაუდო გავრცელების ზონა საქართველოში	45
სურათი 12. ტულარემიის გადამტანები საქართველოში, მღრღნელები:	46
სურათი 12. ტულარემიის გადამტანები საქართველოში ექტოპარაზიტები:.....	46
სურათი 13. ტულარემიის აქტიური კერების განაწილება აღმოსავლეთ საქართველოში	47
სურათი 14. ტულარემიის აქტიური კერები შიდა ქართლში	48
სურათი 15. ტულარემიის აქტიური კერები კახეთში.....	48
სურათი 16. ტულარემიის აქტიური კერები ქვემო ქართლში.....	49
სურათი 17. ტულარემიის აქტიური კერები სამცხე-ჯავახეთში	50
სურათი 18. ტულარემიის აქტიური კერები სამცხესა (ა) და ჯავახეთში (ბ)	51
სურათი 19. ა) ტკიპების მოპოვება; ბ) იქსოდური ტკიპა	53
სურათი 20. ნიმუში - <i>F. tularensis</i> real-time PCR.....	62
სურათი 21. MLVA-25 სისტემის Ft-M3 VNTR-ების გადანაწილების მაგალითი.....	65
სურათი 22. გენეტიკური ანალიზატორი CEQ 8000, Beckman Coulter	67

სურათი 23. მულტიპლექსური MLVA-25 რეაქციის ელექტროფეროგრამები	68
სურათი 24. SNP ფორვარდ პრაიმერების კონკურენციის პრინციპი.....	71
სურათი 25. ა - ლლობის მრუდი; ბ - ლლობის პიკი	75
სურათი 26. სხვადასხვა SNP ალელების განსხვავებული ზომები	75
სურათი 27. Illumina Genome Analyzer II, ჩიპი მასზე მიმაგრებული დნმ ზონდებით და სექვენირების ტექნოლოგიის ეტაპების ამსახველი ილუსტრაციები	78
სურათი 28. <i>F. tularensis</i> PFGE, ენდონუკლეაზა Xho-I	80
სურათი 29 . <i>F. tularensis</i> ქართული შტამების MLVA-25 ტიპირების შედეგად მიღებული ფილოგენეტიკური ხე. განშტოებების ბოლოში მოცემულია Ft.M3, Ft.M4 და Ft.M6 მარკერების ზომები და გენოტიპები.....	85
სურათი 30. <i>F. tularensis</i> ქართული შტამები განთავსდა B.Br.013/014 ფილოგენეტიკურ SNP ქვეჯგუფში.....	89
სურათი 31. <i>F. tularensis</i> ქართული შტამის F0673 დნმ-ის მოკლე თანმიმდევრობების გადაფარვის დიაგრამა შედარებული LVS გენომთან.....	90
სურათი 32. <i>F. tularensis</i> ქართული (F0673) შტამისა და სხვა სრული გენომური თანმიმდევრობების შედეგად აგებული ფილოგენეტიკური ხე.....	91
სურათი 33. SNP ანალიზის შედეგები: ლლობის მრუდები და გელ-ელექტროფორეზი...	94
სურათი 34. <i>F. tularensis</i> ქართულ შტამებს შორის გამოვლინდა ექვსი ქვეჯგუფი.....	95
სურათი 35. A) ქართული ქვეჯგუფის ფილოგენეტიკური ხე B.Br.013 ჯგუფის შიგნით. B) 2009-2012 წლებში იზოლირებული B.Br.028 შტამების MLVA გენოტიპები.....	104
სურათი 36. 2007-2012 წლებში იზოლირებული B.Br.028 შტამების MLVA გენოტიპების გეოგრაფიული გადანაწილება	105

ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი - 1. PCR მეთოდით <i>F. tularensis</i> ქვესახეობების დადგენა.....	31
ცხრილი - 2. <i>F. tularensis</i> სახეობებისა და ქვესახეობების განმასხვავებელი მახასიათებლები	31
ცხრილი - 3 . ტულარემიის კერები და გადამტანები საქართველოში.....	52
ცხრილი - 4. ორ კერაში იზოლირებული <i>F. tularensis</i> შტამების გადანაწილება დეკადების მიხედვით.....	54
ცხრილი - 5. იზოლირებული <i>F. tularensis</i> შტამების გადანაწილება რეგიონებისა და წყაროს მიხედვით.....	54
ცხრილი - 6. დკსჯეც ცოცხალ კულტურათა მუზეუმში არსებული <i>F. tularensis</i> შტამების ზოგადი მონაცემები, 2012 წ.	56
ცხრილი - 7. MLVA-25 სისტემის PCR სარეაქციო ნარევის მომზადების ცხრილი.....	65
ცხრილი - 8. MLVA-25 სისტემის VNTR-ებისა და მათი შესაბამისი პრაიმერების ჩამონათვალი. D2, D3, D4 CEQ-8000 ანალიზატორის ფლუორესცენტული ზონდები	66
ცხრილი - 9. MLVA-25 სისტემის მულტიპლექსური PCR სარეაქციო ნარევის მომზადების ცხრილი	68
ცხრილი - 10. MLVA-11 სისტემის პრაიმერები, PCR სარეაქციო ნარევი, პრაიმერის კონცენტრაცია და ფლუორესცენტული ზონდები ABI ანალიზატორისათვის.	69
ცხრილი - 11. SNP ტიპირებისთვის PCR სარეაქციო ნარევის მომზადების ცხრილი	72
ცხრილი - 12. Melt-MAMA და გელ-ელექტროფორეზით ანალიზისათვის შერჩეული კანონიკური SNP პრაიმერები.....	74
ცხრილი - 13. <i>F. tularensis</i> PCR დადებითი გარემო და კლინიკური ნიმუშები	79
ცხრილი - 14 . PFGE ტიპირებაზე გაშვებული შტამების ჩამონათვალი.....	81
ცხრილი - 15. MLVA-25 ტიპირების შედეგების ცხრილი.....	83
ცხრილი - 16 . კლინიკური და გარემო ნიმუშების მულტიპლექსური MLVA ტიპირების შედეგები	86
ცხრილი - 17. NAU-ში ჩატარებული SNP ტიპირების შედეგების ცხრილი.....	93

ცხრილი - 18. დკსჯეც კოლექციაში არსებული <i>F. tularensis</i> 103 შტამის SNP და MLVA შედგების შემაჯამებელი ცხრილი.....	96
ცხრილი - 19. დკსჯეც-ის კოლექციაში არსებული ყველა შტამის SNP და MLVA ტიპირების შედეგები.....	98
ცხრილი - 20. 2007-2012 წლებში იზოლირებული შტამების MLVA გენოტიპები.....	103

გამოყენებული ტერმინოლოგია

PCR – (Polimerase Chain Reaction) პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია.

real-time PCR – ფლუორესცენტული ზონდებით მიმდინარე პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში.

PFGE – (Pulsed Field Gel-Electrophoresis) გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში.

VNTR – (Variable-Number Tandem Repeats) ცვლადი რაოდენობის ტანდემური განმეორებები.

MLVA – (Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat Analisis) მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი.

SNP – (Single Nucleotide Polymorphism) ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი.

ალელები - მოლეკულურ მარკერზე მიღებული გენოტიპების ვარიანტები.

WGS – (Whole Genome Sequence) სრული გენომური ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა

bp – ნუკლეოტიდური წყვილი.

Kb – კილობაზა - 10^3 ნუკლეოტიდი.

Mb – მეგაბაზა - 10^6 ნუკლეოტიდი

CHAB – (Cystein Heart Agar Base with 9% Sheep Blood) ცისტეინით გამდიდრებული ცხვრის სისხლიანი აგარი

შესავალი

ტულარემია ჩრდილოეთ ნახევარსფეროში გავრცელებული ზოოანთროპონოზური დაავადებაა, რომლის გამომწვევია მცირე ზომის უჯრედშიდა ბაქტერია - *Francisella tularensis*. ინფექციის გადაცემაში მრავალი სახეობის ძუძუმწოვარი და ართროპოდი მონაწილეობს. ინფიცირება შესაძლოა მოხდეს ტკიპის ნაკბენით, დაავადებულ ცხოველთან, ასევე მის ქსოვილთან ან ბიოლოგიურ სითხეებთან უშუალო კონტაქტით, კონტამინირებული საკვებისა და წყლის მიღებით, ინფექციური მასალის შესუნთქვით. შესაბამისად, ტულარემიის კლინიკური გამოვლინება ინფიცირების გზაზეა დამოკიდებული. ამ პათოგენს მრავალი ორგანოს დაზიანება შეუძლია, თუმცა მისი მთავარი სამიზნე მაკროფაგული უჯრედი.

მაღალი ვირულენტობის, იოლი გავრცელების, მძიმე და ხანგრძლივი პოსტ-ინფექციური პერიოდისა და სიკვდილის გამოწვევის უნარის გამო *F. tularensis* განსაკუთრებით საშიშ პათოგენთა რიცხვს მიეკუთვნება.

საქართველოში ტულარემიის შემთხვევა პირველად 1946 წელს, ახალქალაქის რაიონის სოფ. კარძახის სასაზღვრო ჯარის ნაწილში დაფიქსირდა. მას შემდეგ საქართველოს ტერიტორიაზე ტულარემიის რამოდენიმე დიდ აფეთქებასა და მთელ რიგ სპორადულ შემთხვევებს ჰქონდათ ადგილი. ბოლო აფეთქებას 2007 წელს კასპის რაიონის ს. ზემო რენეში ჰქონდა ადგილი. სოფლის ცენტრში მდებარე წყაროს სინჯებიდან მიღებული იყო ტულარემიის ოთხი კულტურა, ხოლო სოფლის წყალსაცავში, რომელიც მოშორებით, მაღლობის თავზე იყო განლაგებული, ნაპოვნი იყო მდრღნელის ლეში.

ლ. საყვარელიძის სახელობის საქართველოს დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრი (დკსჯეც) თავისი 85-წლიანი არსებობის მანძილზე მუდმივად აწარმოებდა განსაკუთრებით საშიში ინფექციების, მათ შორის ტულარემიის ბუნებრივი კერების მონიტორინგს. შედეგად საქართველოს ტერიტორიაზე ორი ბუნებრივი კერა გამოიკვეთა – ქართლ-კახეთისა და მესხეთ-ჯავახეთის.

დღესდღეობით დკსჯეც კოლექციაში *F. tularensis* 103 შტამი ინახება, რომელთა ნატიფი მოლეკულური მეთოდების გამოყენებით გენოტიპირება, მათი პასპორტიზაცია და საერთო მონაცემთა ბაზის შექმნა მოცემული სამუშაოს უმთავრეს ამოცანას წარმოადგენდა. გარდა ამისა, ამ მეთოდების რუტინულ პრაქტიკაში დანერგვა შესაძლებელს გახდიდა ახლად იზოლირებული *F. tularensis* შტამების, კლინიკური და გარემო ნიმუშების წარმომავლობისა და გენეტიკური კავშირების დადგენას და ამით გარემოსა და ადამიანს შორის პათოგენის ცირკულაციაზე დაკვირვების საშუალებას მოგვცემდა.

ლიტერატურული მიმოხილვა

ისტორიული ექსკურსი

ტულარემია ჩრდილოეთ ნახევარსფეროს ზოოანთროპონოზური დაავადებაა. მისი გამომწვევევი პირველად 1912 წელს გ. მაკ-კოიმ და ჩ. ჩაპინმა ამერიკის შეერთებულ შტატებში, კერძოდ ტულარეს პროვინციაში (ცენტრალური კალიფორნია) აღმოაჩინეს და დაარქვეს *Bacterium tularense*. 1919 წელს ედუარდ ფრანცისმა იგი გამოყო ადამიანის სისხლიდან და აღწერა დაავადების პათოლოგიური ცვლილებები შინაურ კურდღლებსა და ზღვის გოჭებში. მანვე შეიმუშავა ტულარემიის სადიაგნოსტიკო მიკრობიოლოგიური და იმუნოლოგიური მეთოდები და აღწერა ადამიანთა დაავადების ლაბორატორიულად



სურათი 1. ე. ფრანცისი და ჰ. ოჰარა

დადასტურებული შემთხვევები. გამომდინარე აქედან, ბაქტერიას დაერქვა *Francisella tularensis*.

1925 წ. - იაპონიაში ჰაჩირო ოჰარამ აღწერა ტულარემიის მსგავსი დაავადება. მისი მეუღლე რიკი ოჰარა დათანხმდა სამეცნიერო ექსპერიმენტში მონაწილეობაზე და ნება დართო მისთვის მარცხენა ხელზე შეეზილათ დაავადებული ბოცვერის ქსოვილები. შედეგად განვითარდა სიცხე და ლიმფადენოპათია. რიკი ოჰარას ლიმფური ჯირკვლის ბიოპტატიდან გამოყოფილი იყო ბაქტერია, რომელიც ე. ფრანცისის მიერ იდენტიფიცირებულ იქნა, როგორც *F. tularensis*.

ისტორიულად ტულარემიის, როგორც დაავადების, პრობლემა ამერიკის შეერთებულ შტატებსა (აშშ) და ყოფილ საბჭოთა კავშირს უკავშირდება. ასე მაგალითად, აშშ-ში, 1990-დან 2000 წლამდე, დაავადების 1400 შემთხვევა აღწერილი, ხოლო 1920-45 წლებში ამ რიცხვმა 14 000-ს გადააჭარბა. (Hayes et al., 2002). მეორე მსოფლიო ომის დროს საბჭოთა კავშირში ტულარემიის ძლიერ აფეთქებას ჰქონდა ადგილი. მარტო 1941-42 წლების ზამთარში, დონის როსტოვის მიმდებარე რეგიონში, ტულარემიის 67 000 შემთხვევა იქნა დაფიქსირებული (Jusatz, 1952).

1930-იანი წლებიდან ტულარემიის ვაქცინის მისაღებად აქტიური მუშაობა დაიწყო; 1942-47 წლებში საბჭოთა მეცნიერებმა ნ. გაისკიმ და ბ. ელბერტმა ტულარემიის

მიკრობის დასუსტების გზით მიიღეს ცოცხალი ატენუირებული ვაქცინა, რომელიც მოსახლეობის მასიური ვაქცინაციისთვის იქნა გამოყენებული. ამ ღონისძიებამ დიდი როლი ითამაშა დაავადების დაძლევაში.

1956 წელს ვაქცინა აშშ-ში გადაიგზავნა, სადაც ცოცხალი ვაქცინალური შტამის (Live Vaccine Strain - LVS) სახელით გახდა ცნობილი. იგი აშშ თავდაცვის დეპარტამენტის მიერ რისკ-ჯგუფის პერსონალის ასაცრელად გამოიყენებოდა. თუმცა მისი მოხმარება საკვლევი ვაქცინის სტატუსით ხდებოდა და იგი დღემდე არაა ლიცენზირებული აშშ-ში რეგულარული აცრებისათვის.

1950-60-იან წლებში აშშ-ში ჩატარდა კვლევები, სადაც მოხალისეებს LVS შტამით ცრიდნენ და ერთი წლის შემდეგ ტულარემიის ვირულენტური შტამით (SchuS4) ინჰალაციის გზით აინფიცირებდნენ. ყველა მონაწილე ავად გახდა, თუმცა აცრილებს აუცრელებთან შედარებით შედარებით სუსტად გამოხატული სიმპტომები ჰქონდათ (Eigelsbach HT, Hornick RB, Tulis JJ, 1967).

სხვა კვლევის მიხედვით ლაბორატორიული პერსონალის აცრის შემდეგ ტიფოიდური ტულარემიის შემთხვევები საგრძნობლად შემცირდა: 1950-1959 წლებში რეგისტრირებული იყო 5.7, ხოლო ვაქცინაციის შემდგომ 1960-1969 წლებში 0.27 ყოველ 1000 რისკ ჯგუფის თანამშრომელზე. წყლულოვან-ბუბონური ფორმების რაოდენობა უცვლელი დარჩა, თუმცა შესუსტებული სიმპტომატიკით (Burke DS, 1977). ამ მონაცემების საფუძველზე ჩამოყალიბდა მოსაზრება, რომ ლაბორატორიული თანამშრომლების აცრით შესაძლებელია ლაბორატორიაში ინფიცირების შემთხვევათა შემცირება (Rusnak JM et al., 2004)

დღეისათვის LVS არ არის ვაქცინაციისთვის ხელმისაწვდომი აშშ-ში, ევროპასა და მსოფლიოს უმეტეს ქვეყნებში. მისი გამოყენება მხოლოდ პოსტ-საბჭოთა სივრცის რამოდენიმე ქვეყანაში ხდება. ამასთან ჯერჯერობით არ არსებობს ალტერნატიული ვაქცინა, რომელიც მას ჩაანაცვლებდა, თუმცა ამ მიმართულებით მუდმივად მიმდინარეობს კვლევები.

მეორე მსოფლიო ომის გამოცდილებიდან გამომდინარე შესაძლებელია გაკეთდეს დასკვნა, რომ ტულარემია საგრძნობლად მატულობს ომის, განსაკუთრებით კი

პოზიციური, ანუ სასანგრო ომის დროს, ასევე სტიქიური უბედურებების შედეგად, როდესაც ადგილი აქვს საზოგადოების ჰიგიენურ-სანიტარული ნორმების დარღვევას (WHO Guidelines on Tularemia, 2007).

მიკრობის ზოგადი დახასიათება

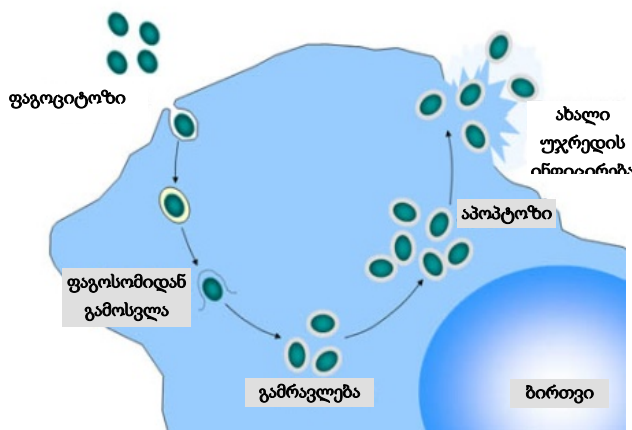
F. tularensis ცნობილია, როგორც ერთერთი ყველაზე მაღალვირულენტური ინფექციური აგენტი ადამიანებისა და რიგი ძუძუმწოვრებისათვის. დაავადების გადაცემა შესაძლოა მოხდეს ართროპოდის ნაკბენით, დაავადებულ ცხოველთან, ასევე მის ქსოვილთან ან ბიოლოგიურ სითხეებთან უშუალო კონტაქტით, კონტამინირებული საკვებისა და წყლის მიღებით და ინფექციური მასალის შესუნთქვით. ლაბორატორიულ თავგებზე ჩატარებული ცდებით დადგინდა, რომ დაავადების გამოწვევისათვის საკმარისი ბაქტერიული დოზა 1 მიკრობს შეადგენს. მიუხედავად ასეთი მაღალი ვირულენტობისა, ტულარემიის ადამიანიდან ადამიანზე გადაცემის ფაქტი დღემდე რეგისტრირებული არ ყოფილა. თუმცა, აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ ავადმყოფის რესპირატორული სითხეები ტულარემიის ცოცხალი მიკრობის შემცველია, რომლის გარემოში გამოყოფა ხველებისა და ცემინების დროს ხდება (WHO Guidelines on Tularemia, 2007; Jones R. M., et al. 2005).

მიკრობი ადამიანის ორგანიზმში იჭრება კანიდან, ლორწოვანი გარსიდან, კუჭ-ნაწლავის ტრაქტიდან და ფილტვებიდან. დაავადების გამოწვევა ნებისმიერი ასაკის ინდივიდებშია შესაძლებელი. პროფესიული საქმიანობიდან გამომდინარე ტულარემიის შემთხვევები მამაკაცებში უფრო ხშირია, ვიდრე ქალებში. *F. tularensis* გავრცელება ფართო გეოგრაფიული ვარიაბელობით გამოირჩევა და მეტწილად სეზონურ ხასიათს ატარებს. იმ ქვეყნებში, სადაც ტულარემია ენდემურ დაავადებად ითვლება, შემთხვევების რაოდენობის მაქსიმუმი გვიანი გაზაფხულიდან ადრე შემოდგომამდე გვხვდება. ხშირად შემთხვევების რაოდენობა წლიდან წლამდე იცვლება, რაც შესაძლოა კლიმატურ პირობებთან (ტემპერატურა, ნალექის რაოდენობა) იყოს დაკავშირებული. ეს მეტად მნიშვნელოვანი საკითხი დღემდე ღიად რჩება და მომავალში მისი დეტალური შესწავლით შესაძლებელი გახდება აფეთქებისა და ეპიდემიის წინასწარი პროგნოზირება

და მისი თავიდან აცილების მიზნით ეფექტური პრევენციული ზომების მიღება (WHO Guidelines on Tularemia, 2007).

მაღალი ვირულენტობის, იოლი გავრცელების, დაავადების, მძიმე და ხანგრძლივი პოსტ-ინფექციური პერიოდისა და სიკვდილის გამოწვევის რეალური საფრთხის გამო *F. tularensis* მიჩნეულია ადამიანების მასიური განადგურების პოტენციურ ბიოლოგიურ იარაღად.

F. tularensis პატარა ზომის (0.2-0.7 მკმ) გრამ-უარყოფითი, უძრავი, მკაცრად აერობული, სპორის არწარმოქმნელი კოკობაქტერიაა (Chu & Weyant, 2003; Sjöstedt, 2005). უჯრედები პლემორფულია, მეტწილად მოკლე ჩხირის ან კოკის ფორმის. გააჩნია ცხიმოვანი მჟავებით მდიდარი ორშრიანი უჯრედული კედელი და კაფსულა. ელექტრონული მიკროსკოპის მეშვეობით *F. tularensis* ზედაპირზე ნანახია ე.წ. პილემი (Gil H, Benach JL, Thanassi, 2004). მიკროორგანიზმი ბიოქიმიურად შედარებით ინერტულია და მხოლოდ რამოდენიმე შაქრის (გლუკოზა, მალტოზა, საქაროზა და



სურათი 2. *F. tularensis* რეპლიკაცია მაკროფაგში

გლიცერინი) დაშლის უნარი გააჩნია. იგი არ აღადგენს ნიტრატს, არის ოქსიდაზა და ურეაზა ნეგატიური და სუსტად კატალაზა პოზიტიური (WHO Guidelines on Tularemia, 2007).

F. tularensis პათოგენეზში ბევრი რამ დღემდე გაურკვეველია. ცნობილია, რომ ძუძუმწოვარი მასპინძლის ინფიცირების შემდეგ ბაქტერია აღწევს მაკროფაგებს და განიცდის ფაგოციტოზს. გარკვეული მექანიზმის მეშვეობით მაკროფაგში შეჭრილი *F. tularensis* აინჰიბირებს ფაგოსომისა და ლიზოსომის შერწყმას, სწრაფად ტოვებს ფაგოსომას, ინაცვლებს უჯრედის ციტოპლაზმაში და იწყებს უჯრედში გამრავლებას. ინფიცირებიდან 12 საათში *F. tularensis* აღწევს გამრავლების ლოგარითმულ ფაზას, იწვევს უჯრედის აპოპტოზს, გამოდის უჯრედშორის სივრცეში და აინფიცირებს ახალ მაკროფაგს.

F. tularensis გენომი საშუალოდ 1,9 Mb სიგრძის წრიული ქრომოსომისაგან შედგება. ვირულენტობასთან ასოცირებული გენები ლოკალიზებულია ე.წ. პათოგენურობის კუნძულებზე, რომლებიც ერთმანეთის მიყოლებითაა განლაგებული *F. tularensis* გენომში. გარდა ამისა ბაქტერია მდიდარია ჩართული ტრანსპოზონული (IS elements) თანამიმდევრობებით.

ტულარემიის მიკრობის ლაბორატორიულ პირობებში გამრავლებისათვის სპეციალური, გამდიდრებული საკვები არეები გამოიყენება. ერთერთ საუკეთესო ნიადაგებად ითვლება ცისტეინით გამდიდრებული 1% ჰემოგლობინიანი (შოკოლადისებური) ან 9% ცხვრის სისხლიანი (CHAB) ნიადაგები, რომლებზედაც 2-4 დღიანი ინკუბაციის შემდეგ ამობურცული, რძისფერი პრიალა კოლონიები ფორმირდება. *F. tularensis* გააჩნია თხელი, ლიპოპროტეინების შემცველი მემბრანა. იგი არ წარმოქმნის სპორას, თუმცა თვეობით ძლებს წყალში დაბალ ტემპერატურაზე, ტენიან ნიადაგში, თივასა და ჩალაში და ცხოველების ხრწნად ნარჩენებში.

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, *F. tularensis* ფაკულტატიური უჯრედშიდა პათოგენია და მრავლდება მაკროფაგებში. კანიდან ან ლორწოვანიდან შეჭრის ადგილზე ჩნდება წყლული. ამის შემდეგ ბაქტერია ინაცვლებს ადგილობრივ ლიმფურ ჯირკვლებში და იწყებს მაკროფაგებში გამრავლებას, რის შედეგადაც იწყება ლიმფური ჯირკვლების ძლიერი გადიდება. დაავადების შემდეგ ეტაპზე ტულარემიის მიკრობი უკვე სხვა ორგანოებში ინაცვლებს. მის ძირითად სამიზნეებს ლიმფური ჯირკვლები, ფილტვები, პლევრა, ელენთა, ღვიძლი და თირკმელები წარმოადგენენ.

ტულარემიის კლინიკური გამოვლინებები დამოკიდებულია ინფიცირების გზაზე. არსებობს ბუბონური, წყლულოვან-ბუბონური, თვალის, ანგინოზურ-ბუბონური, ნაწლავის, ფილტვის და გენერალიზებული ფორმები. დაავადებას თან ახლავს ალერგიული რეაქცია, რომელიც ხანგრძლივი დროით ან სამუდამოდ რჩება. ჰაერ-წვეთოვანი გზით გადაცემისას ვითარდება ატიპური პნევმონია რესპირატორული სიმპტომატიკის გარეშე. რეგიონული ჯირკვლების გადიდებას ადგილი აქვს დაავადების თითქმის ყველა ფორმის დროს.

კლასიფიკაცია

ოჯახი Francisellaceae ეკუთვნის ქვეკლასს Proteobacteria (Sjöstedt, 2005). გვარი *Francisella* რომელიც თავის მხრივ ამ ოჯახის ერთადერთი წევრია, მოიცავს ორ სახეობას: *F. tularensis* და *F. philomiragia* ამ ორი ბაქტერიის 16S რიბოსომული რნმ-ის თანმიმდევრობაში 98,3% მსგავსებაა ნანახი (Forsman M, et al., 1994). Francisellaceae ოჯახს ძალიან დამახასიათებელი ფენოტიპური მახასიათებლები გააჩნია: მის წარმომადგენლებს აქვთ კოკოიდური მორფოლოგია, არიან გრამ-ნეგატიურები, კარბოჰიდრატებს შლიან შეზღუდული რაოდენობით აირის წარმოქმნის გარეშე და გააჩნიათ ცხიმოვანი მჟავების უნიკალური კომპოზიცია. მათი ზრდისათვის აუცილებელი კომპონენტია ცისტეინი (Sjöstedt, 2005).

F. tularensis ოთხი ძირითადი ქვესახეობა არსებობს, რომლებიც განსხვავდებიან ბიოქიმიური თვისებებით, ეპიდემიოლოგიითა და ვირულენტობით. მათი 16S რიბოსომული რნმ თანმიმდევრობა 99,8%-ით იდენტურია (Forsman M, et al., 1994).

F. tularensis ქვესახეობა *tularensis* (ტიპი A) გამოყოფილია ჩრდილოეთ ამერიკაში და მხოლოდ ამ კონტინენტზეა გავრცელებული. ვრცელდება ტკიპების მეშვეობით კურდღლებიდან ადამიანზე და ასევე დაავადებულ ცხოველთან უშუალო კონტაქტით. იგი ყველაზე მაღალვირულენტურია ქვესახეობებს შორის. დაავადების გამოწვევისთვის საკმარისია 10 ბაქტერია ინექციის ან 25 აეროზოლის სახით. ანტიბიოტიკების შემოსვლამდე სიკვდილიანობა ადამიანებში 5-10%-ს შეადგენდა. მიუხედავად ამისა ადამიანიდან ადამიანზე დაავადების გადაცემა არ დაფიქსირებულა. მისი მაღალი ვირულენტობა დღემდე სერიოზულ საფრთხეს წარმოადგენს ლაბორატორიული კვლევების დროს.

F. tularensis ქვესახეობა *holarctica* ანუ *polarctica* (ტიპი B) უფრო ფართოდაა გავრცელებული მსოფლიოს ჩრდილოეთ ნახევარსფეროში და იქ არსებული ერთადერთი ქვეტიპია. იგი ნაკლებად ვირულენტურია, ვიდრე A ტიპი და ამ თვისების გამო გამოიყენება ახალი თერაპიული და სადიაგნოსტიკო მეთოდების შემუშავებისათვის. მისი ძირითადი გადამტანები მღრღნელები და კურდღლებია. დაავადება ვრცელდება ინფიცირებულ ცხოველებთან უშუალო კონტაქტით,

დაბინძურებული საკვებისა და წყლის მიღებით და ტკიპების ნაკბენით. ადამიანებში იგი ლეტალურ შედეგს არ იწვევს, თუმცა შეუძლია მძიმე და ხანგრძლივი დაავადების გამოწვევა.

F. tularensis მესამე ქვესახეობა *mediaasiatica* მხოლოდ შუა აზიის ქვეყნებში – ყაზახეთსა და თურქმენეთშია დაფიქსირებული. ეს ქვესახეობა ნაკლებადაა შესწავლილი. კურდღლებზე ჩატარებული ექსპერიმენტული კვებების მიხედვით დადგინდა, რომ მას B ტიპის მსგავსი საშუალო ვირულენტობა ახასიათებს.

F. tularensis ყველაზე ახალი ქვესახეობა *novicida* პირველად წყლიდან იქნა გამოყოფილი ავსტრალიაში და სამხრეთ ნახევარსფეროში დაფიქსირებული ერთადერთი ქვესახეობაა. იგი ამერიკის კონტინენტზეც გვხვდება, დაბალვირულენტურია და ადამიანების ინფიცირებას ძალზედ იშვიათად იწვევს. დაავადების გამოწვევა მას ძირითადად იმუნოდეფიციტის მქონე ადამიანებში შეუძლია.

გვარი *Francisella* მეორე წარმომადგენელი *F. philomiragia* მარილიანი წყლიდანაა გამოყოფილი (ატლანტიკის ოკეანე და ხმელთაშუა ზღვა). ისევე, როგორც ქვესახეობა *novicida* იგი დაბალვირულენტური პათოგენია და დაავადებას ისიც მხოლოდ იმუნოდეფიციტის მქონე ადამიანებში იწვევს (WHO Guidelines on Tularemia, 2007).

მიკრობთა ამ ჯგუფის კლასიფიკაცია სქემატურად ასე შეიძლება წარმოვიდგინოთ:

- კლასი – Proteobacteria
- ქვეკლასი - Gammaproteobacteria
- ❖ ოჯახი - Francisellaceae
 - გვარი *Francisella*
 - ✓ სახეობა *F. philomiragia*
 - ✓ სახეობა *F. tularensis*
 - ქვესახეობა *tularensis* (ტიპი A1, A2)
 - ქვესახეობა *holarctica* (ტიპი B)
 - ქვესახეობა *mediaasiatica*
 - ქვესახეობა *novicida*

ქვესახეობების შემდგომი დაყოფა უკვე შტამებად და იზოლატებად ხდება. იზოლატი ერთი კოლონიიდან მიღებული ბაქტერიების პოპულაციაა. ხოლო შტამი ესაა იზოლატი ან იზოლატების ჯგუფი, რომელიც ამავე სახეობის სხვა იზოლატებისგან სპეციფიკური გენეტიკური ან ფენოტიპური თვისებებით განსხვავდება (WHO Guidelines on Tularemia, 2007).

ეპიდემიოლოგია

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ადამიანიდან ადამიანზე ტულარემიის გადაცემის ფაქტი დღემდე არ დაფიქსირებულა. კლინიკური ნიმუშიდან *F. tularensis* იზოლატის მიღებაც შედარებით მეტ დროსა და ძალისხმევას მოითხოვს დღევანდელ პირობებშიც კი. სამაგიეროდ მისი გამოყოფა მრავალი ისეთი ცხოველიდანაა შესაძლებელი, რომლებიც ადამიანებზე გადაცემის ვექტორებად შეგვიძლია მივიჩნიოთ. *F. tularensis tularensis* - A ტიპი - მეტწილად ასოცირდება კურდღლებთან, ცხვრებთან და ტკიპებთან. *F. tularensis holarctica* - B ტიპი - ხშირად გამოიყოფა წყაროებიდან, ტბებიდან და მდინარეებიდან, რაშიც შესაძლოა მნიშვნელოვან როლს თამაშობდნენ თახვები და ონდატრები ჩრდილო ამერიკაში და თახვები და ლემინგები სკანდინავიაში (Parker RR et al. 1951; Hopla CE, 1994). არსებობს მონაცემები, რომ *F. tularensis* მიკრობს წყლის პროტოზოებში თვეების მანძილზე შეუძლია არსებობა (Berdal et al. 2000). უნდა აღინიშნოს, რომ *F. tularensis* ეპიზოოტია არ არის ბოლომდე შესწავლილი. დღემდე გაურკვეველია მრავალი ძუძუმწოვარისა და ფეხსახსრიანის როგორც ტულარემიის გადაცემაში მონაწილე რეზერვუარისა და ვექტორის როლი (WHO Guidelines on Tularemia, 2007).

ტულარემია ჩრდილოეთ ნახევარსფეროს მრავალ ქვეყანაშია დაფიქსირებული. სამხრეთში, კერძოდ ავსტრალიაში, იზოლირებული იყო მხოლოდ *F. tularensis novicida* რომელსაც არ გააჩნია ტულარემიისთვის დამახასიათებელი კლინიკური ნიშნები (Whipp, 2003). ენდემური კერები დიდი ხანია არსებობს რუსეთის ფედერაციაში, ყაზახეთსა და თურქმენეთში (Olsufiev, 1977), ფინეთსა და შვედეთში (Tarnvic, Priebe, Grunow, 2004). დაავადება ყოველწლიურად რეგისტრირდება აღმოსავლეთ ევროპაში, მაშინ, როცა დასავლეთ ევროპაში მხოლოდ ერთეულ შემთხვევებს აქვთ ადგილი.

აღმოსავლეთ ნახევარსფეროში დაავადება მუდმივად ფიქსირდება აშშ-სა და კანადაში, იშვიათად – მექსიკაში. ასე მაგალითად აშშ-ში 1990-2000 წლებში ყოველწლიურად 120 შემთხვევას ჰქონდა ადგილი (Hayes et al. 2002). აქედან 50% მოიცავდა არკანზასს, მისურის, სამხრ. დაკოტას და ოკლაჰომას. შედარებით მცირე აფეთქებას ჰქონდა ადგილი კუნძულზე მარტას ვენახი, მასაჩუსეტსი (Feldman et al. 2001, Feldman et al. 2003). ორი ლეთალური შემთხვევა, რომელიც ამ აფეთქებას უკავშირდება, გამოწვეული იყო ბალახის საკრეჭი მანქანით ინფიცირებული კურდღლის ლემის დაქუცმაცებითა და მიკრობის აეროზოლის ფორმაში გადაყვანით.

ვექტორები - ფეხსახსრიანები

ტულარემიის გადამტანი ვექტორები ფეხსახსრიანთა ფართო სპექტრს მოიცავს. აშშ-ში Rocky Mountains მასივის აღმოსავლეთით ყველაზე მნიშვნელოვან ვექტორებად ტკიპები ითვლებიან. აქ აღმოჩენილ იქნა ტკიპების 13 სახეობა, რომლებიც ოთხ გვარს წარმოადგენენ: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* და *Ixodes* (Hopla, 1974). იუტაში, ნევადასა და კალიფორნიაში ძირითადი გადამტანები რწყილები (*Chrysops* spp.) არიან (Jellison, 1950). ყოფილ საბჭოთა კავშირში ბაქტერიის გადატანა დაფიქსირდა მოსკიტებისა (*Aedes* spp., *Culex* spp., *Anopheles* spp.) და ტკიპების მეშვეობით (*Ixodes* spp.), თუმცა 1960-64 წლებში ჩატარებული კვლევების მიხედვით ტკიპებში ბაქტერიის პრევალირება მხოლოდ 0.01% აღმოჩნდა (Olsufiev, Dunaeva, 1970). ცენტრალურ ევროპაში მნიშვნელოვანი ვექტორები არიან ტკიპები *Dermacentor reticulatus* და *Ixodes ricinus*. (Hubalek et al., 1997). შვედეთში დემონსტრირებული იყო *A. cinereus* სახეობის კოლოების ინფიცირებულობა (Olin, 1942). აშშ-სა და ყოფილი სსრკ-ს მონაცემების მიხედვით Tabanidae ოჯახის რწყილებს შეუძლიათ დაავადების გადატანა (Krinsky, 1976). ამ ოჯახში შედიან ცხენისა (*Tabanus* spp., *Chrysozona* spp.) და ირმის (*Chrysops* spp.) სისხლისმწოველი რწყილები, რომლებიც ფაქტიურად მთელს მსოფლიოში არიან გავრცელებულები. *F. tularensis* აღმოჩენილი იყო რწყილების რვა გვარის (*Amphipsylla*, *Cediopsylla*, *Ceratophyllus*, *Ctenophthalmus*, *Malaracus*, *Megabothris*, *Neopsylla*, *Pulex*) 20 სახეობაში, თუმცა მათი როლი ამ დაავადების გადატანაში დღემდე დაუდგენელია

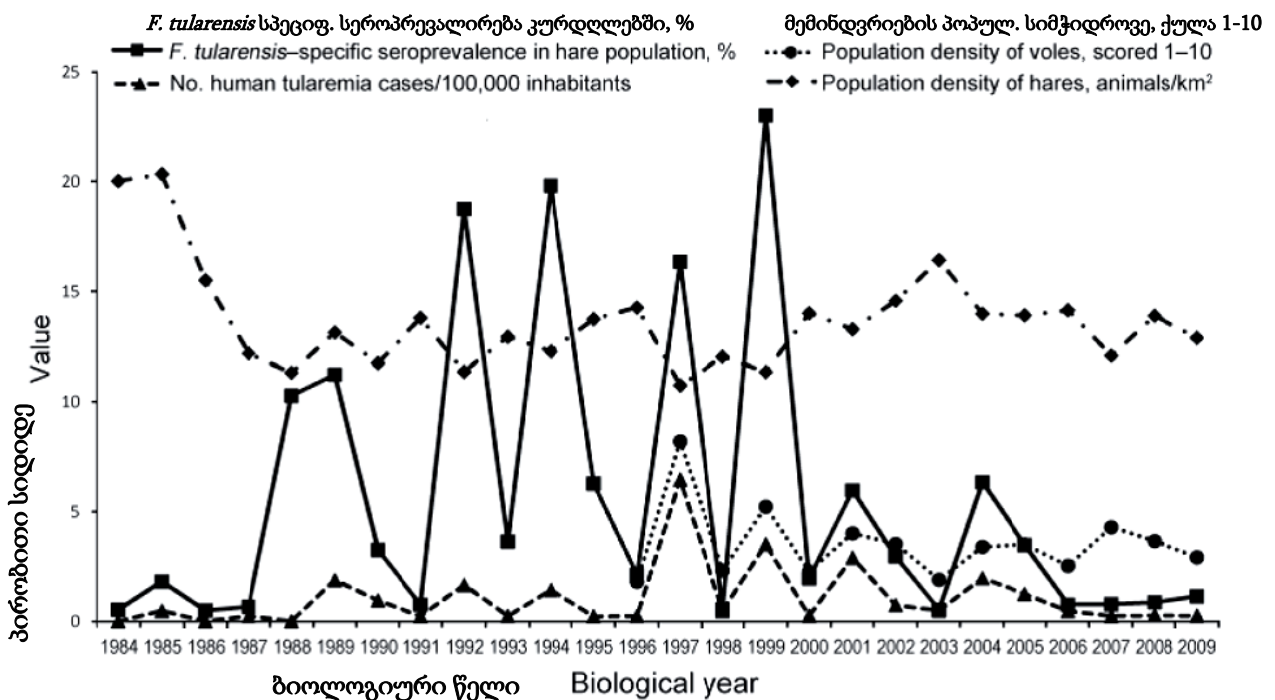
(Olsufiev, Dunaeva, 1970). აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ რწყილებისა და კოლოების სანერწყვე ჯირკვლებში *F. tularensis* არასოდეს დაფიქსირებულა. ამიტომ სავარაუდოდ ამ მწერების როლი დაავადების გადატანაში უფრო მექანიკურ ხასიათს ატარებს. ეს შესაძლოა გამოწვეული იყოს მწერის პირის აპარატის ინფიცირებით დაავადებული მასპინძლის კბენისას, თუმცა მწერის ინფიცირება წყალიდანაც არის შესაძლებელი (Pavlovski, 1966).

ვექტორები - ძუძუმწოვრები

ტულარემიის გავრცელება ბუნებაში ძირითად ხმელეთისა და წყლის ძუძუმწოვრების მეშვეობით ხდება. ამ გადამტანებში შედიან ციყვები, კურდღლები, ბოცვრები, თახვები, ონდატრები და განსაკუთრებით მღრღნელები – წყლის მემინდვრიები და ველის მემინდვრიები. საბჭოთა კავშირში ჩატარებული კვლევების საფუძველზე ძირითად გადამტანებად მიჩნეულები არიან მემინდვრიები და თაგვები (Olsufiev, 1977), კერძოდ კი წყლის ვირთაგვა (*Arvicola terrestris*), ჩვეულებრივი მემინდვრია (*Microtus arvalis*), ტყის მემინდვრიები (*Clethrionomys* spp.) და სახლის თაგვი (*Mus musculus*). ცნობილია ასევე სხვა ძუძუმწოვრების როლი ტულარემიის გადაცემაში. კერძოდ, ევროპაში კურდღლების გატყავებისას მონადირეების ინფიცირების უამრავი შემთხვევაა დარეგისტრირებული (Pfahler-Jung, 1989). ხოლო აშშ-ში ტკიპიდან კურდღლების და შემდგომ ადამიანებისა და სხვა ძუძუმწოვრების ინფიცირება *F. tularensis* ქვესახეობა *tularensis* გავრცელების ციკლის ერთერთი უმთავრესი გზაა (Taylor et al., 1991). მაგალითად “მარტას ვენახის” გახმაურებული შემთხვევის დროს ინფიცირება ბალახის საჭრელი მანქანით კურდღლის ლეშის დაქუცმაცების დროს მოხდა. (Feldman KA et al., 2001).

ტულარემიის აფეთქება ადამიანებში ხშირად მოსდევს ეპიზოოტიას მღრღნელებში. რაც თავის მხრივ მღრღნელების პოპულაციის სიმჭიდროვის ზრდას უკავშირდება. ასე მაგალითად, 1956-2000 წლებში რუსეთის ფედერაციის ნოვოსიბირსკის რაიონში ადამიანთა შემთხვევების რაოდენობა აშკარად კორელირებდა წყლის ვირთაგვების პოპულაციის სიმჭიდროვესთან (Efimov, Galaktionov & Galaktionova, 2003).

მაგალითად, ითვლებოდა, რომ აღმოსავლეთ უნგრეთში ჩვეულებრივი მემინდვრის (*Microtus arvalis*) პოპულაციის რაოდენობის 2-3 წლიანი დინამიკა ტულარემიის ეკოლოგიის ძირითადი განმსაზღვრელი ფაქტორი იყო (Friend M., 2006). თუმცა, 25 წლიანი მონაცემების შეჯამების შედეგად შეამჩნიეს, რომ ევროპული კურდღლების (*Lepus europaeus*) პოპულაციის რაოდენობის ზრდა პირდაპირ პროპორციული იყო ამავე სახეობაში ტულარემიის სეროპრევალირებასთან. ამასთან, ამავე წლებში ადგილი ჰქონდა ჩვეულებრივი მემინდვრის პოპულაციის ზრდას და ადამიანებში ტულარემიის შემთხვევების რაოდენობის მატებას (სურ. 3) (Gyuranecz M., et al., 2012b).



სურათი 3. ევროპული კურდღლებისა (ცხოველების რაოდენობა 1 კმ²) და ჩვეულებრივი მემინდვრის (1 ჰა-ზე აქტიური ბუდეების რაოდენობის პირობითი სიდიდე 1-დან 10-მდე) პოპულაციების სიმჭიდროვე, კურდღლებში *F. tularensis* სპეციფიკური სეროპრევალირება და ადამიანებში ტულარემიის შემთხვევების რაოდენობა (Gyuranecz M., et al., 2012b).

ამგვარი კორელაციის ახსნა შემდეგნაირად შეიძლება: მემინდვრები B ტიპის ტულარემიის მიმართ ძალიან მგრძნობიარეები არიან, მაშინ როცა ინფიცირებული კურდღლების დიდი ნაწილი შეიძლება ცოცხალი დარჩეს და დაავადების შემდგომი გავრცელების წყაროდ იქცეს. მემინდვრების პოპულაციის მაღალი სიმჭიდროვის პერიოდში ადგილი აქვს ცხოველების აგრესიულ მოქმედებას და კანიბალიზმს, რაც

თავის მხრივ მათი სხეულის ინფექციური გამონაყოფებით გარემოს დაბინძურების რისკს ზრდის. ასეთი გაძლიერებული გადაცემის პროცესში ინფიცირებულმა კურდღლებმა შეიძლება გაცილებით გაზარდონ დაავადების გავრცელების არეალი. ამავდროულად კურდღლები ინფიცირებულ ტკიპებთან ერთად შესაძლებელია ტულარემიის რეზერვუარებად იქცნენ.

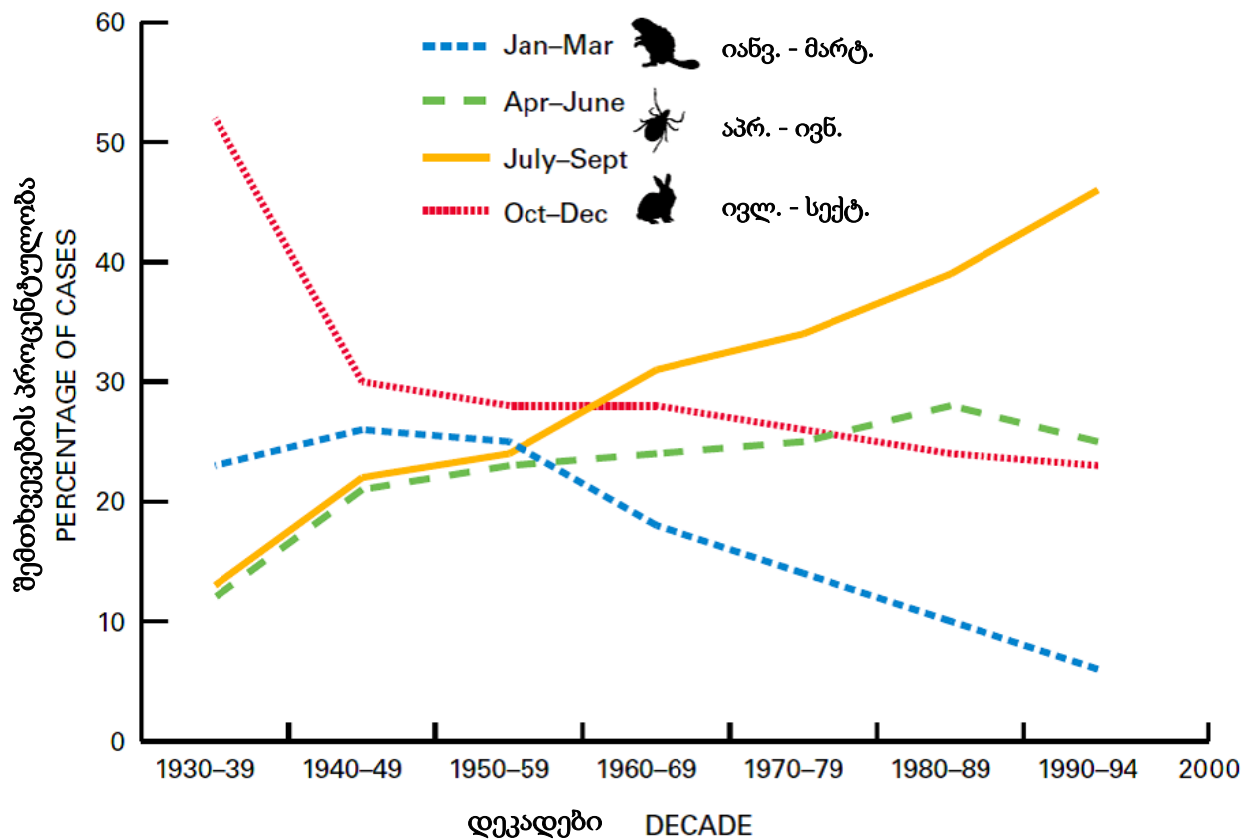
ტულარემიის სეზონურობა

ტულარემიის სეზონურობა სხვადასხვა ფაქტორებით განისაზღვრება. ტკიპების აქტიური ცხოველმოქმედება ადრე გაზაფხულიდან გვიან შემოდგომამდე გრძელდება, შესაბამისად, ეპიზოოტიებსაც ამავე პერიოდში აქვთ ადგილი. ტულარემიის შემთხვევები ხშირად ადამიანების პროფესიულ ან სპორტულ აქტივობებს უკავშირდება.

ასე მაგალითად, შემთხვევების რაოდენობა მატულობს საშემოდგომო სამუშაოების დროს და ნადირობის სეზონზე, ანუ ძირითადად გვიანი შემოდგომიდან ადრე გაზაფხულამდე. ამავე პერიოდში ადგილი აქვს მღრღნელების დასახლებული პუნქტებისაკენ მასიურ გადანაცვლებასაც, რაც ასევე ზრდის ინფიცირების საფრთხეს. თუმცა ამავდროულად, ქვეყნების უმრავლესობაში, სადაც ტულარემია ენდემურ დაავადებად ითვლება, ინციდენტობა მაქსიმუმს გვიან გაზაფხულზე, ზაფხულის თვეებსა და ადრეულ შემოდგომაზე აღწევს.

კიდევ ერთი მაგალითის სახით შეიძლება მოვიყვანოთ აშშ-ში ტულარემიის შემთხვევების სეზონური გადანაწილების ცვლილება 1930-2000 წლებში (სურ. 4.). გრაფიკზე ჩანს, რომ 1930-იანი წლებიდან ოქტომბერ-დეკემბერის სეზონზე ტულარემიის შემთხვევების კლება მამაკაცების მე-2 მსოფლიო ომში მონაწილეობას და შესაბამისად მონადირეთა რაოდენობის შემცირებას უნდა უკავშირდებოდეს; ანალოგიურად, 1950-იანი წლებიდან ბაზარზე ბეწვეულზე მოთხოვნილების დაკლების შედეგად, მოიკლო თახვებისა და ონდატრების დაჭერის აუცილებლობამაც, რამაც თავის მხრივ იანვარ-მარტში დაავადების კლება გამოიწვია. ხოლო სხვა სეზონებზე ტულარემიის შემთხვევების თანდათანობითი მატება უნდა უკავშირდებოდეს როგორც ზემოთ ჩამოთვლილ მიზეზებს, ანუ ნადირობისა და ბეწვეულის მოპოვებაზე

მოთხოვნილების შემცირებას, ისე ზაფხულობით ბუნებაში ტურისტების რაოდენობის მატებასა და შესაბამისად ტკიპებით გამოწვეული შემთხვევების ზრდას (Friend M., 2006).



სურათი 4. ტულარემიის სეზონურობის ცვლილება აშშ-ში 1930-2000 წლებში (Friend M., 2006)

მიკრობის დიაგნოსტიკა და გენოტიპირება

დღეისათვის *F. tularensis* დიაგნოსტიკის მრავალი მეთოდი არსებობს.

- ბაქტერიოლოგიური (იზოლაციის მიღება);
- სეროლოგიური ანუ ტულარემიის საწინააღმდეგო ანტისხეულების აღმოჩენა (აგლუტინაციის რეაქცია, იმუნოფერმენტული ანალიზი);
- მიკრობის ანტიგენის დეტექცია (ფლუორესცენტული მიკროსკოპირება);
- დნმ-ის დეტექცია (მოლეკულური მეთოდები);

შესაბამისად, ეს მეთოდები გამოიყენება შემთხვევის შეფასებისა და გარემო ნიმუშების კვლევისათვის. ტულარემიის შემთხვევის შეფასების სამი კრიტერიუმი არსებობს:

- შესაძლო (ინფექციასთან კონტაქტისა და კლინიკური სიმპტომების ერთობლიობა);
- სავარაუდო (კლინიკური ნიშნები, დადებითი პასუხი ანტიგენზე ან ბაქტერიულ დნმ-ზე, ან დადებითი შრატი);
- დადასტურებული (კულტურის მიღება, მისი ანტიგენით ან დნმ-ით დადასტურება, წყვილ შრატებში ტიტრის ოთხჯერადი ცვლილება აგლუტინაციით, ან ერთი დადებითი შრატი იმუნოფერმენტული ანალიზით).

აღამიანიდან საკვლევი მასალის აღება უნდა ხდებოდეს კვლევის მეთოდიდან გამომდინარე. ცოცხალი ბაქტერიის სადეტექციოდ ნიმუშები ანტიბიოტიკების მიღებამდე უნდა იქნას აღებული. ნიმუშის არჩევა კლინიკური გამოვლინების მიხედვით უნდა მოხდეს:

✓ მთლიანი სისხლი - ამ ნიმუშის აღება დაავადების ყველა ფორმის დროს შეიძლება. ნიმუშის აღების დროს არ უნდა იყოს გამოყენებული ჰეპარინი, რომელმაც შესაძლოა პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (PCR) ინჰიბირება გამოიწვიოს.

✓ შრატი (ან პლაზმა, ან სისხლის მშრალი წვეთი აღებული ფილტრის ქაღალდზე) - ყველა კლინიკური ფორმის დროს უნდა იყოს აღებული. შრატის პირველი პორციის აღება ჩვეულებრივ დაავადების ადრეულ პერიოდში ხდება, მეორე პორციის კი მინიმუმ 14 დღის ან 3-4 კვირის შემდეგ, გამოჯანმრთელების ფაზის დადგომის შემდეგ.

ანტისხეულების ტიტრის ცვლილებაზე დაკვირვებით, შესაძლებელი ხდება დაავადების დინამიკის შესწავლა.

✓ რესპირატორული სეკრეციები – ფარინგეალური ნაცხები, ბრონქიალური ამონარეცხები ან ასპირატები, ნახველი, პლევრალური სითხე - ტულარემიის რესპირატორული, ტიფოიდური, ოროფარინგეალური ფორმების დიაგნოსტიკისათვის გამოიყენება.

✓ ნაცხები - ეს ნიმუშები აღებულ უნდა იქნას სხეულის დაზიანებული უბნებიდან წყლულოვან-გლანდულარული ან ოკულოგლანდულარული ტულარემიის დროს.

✓ ასპირატები - მათი აღება ხდება წყლულოვან-გლანდულარული, გლანდულარული, ოროფარინგეალური კლინიკური ფორმების დროს შემუშავებული თუ დაზიანებული ჯირკვლებიდან და ქსოვილებიდან.

✓ ქსოვილის ბიოფსია – აღება ხდება ლიმფური ჯირკვლებიდან (წყლულოვან-გლანდულარული, გლანდულარული, ოროფარინგეალური ფორმების დროს), თუმცა მწვავე ფაზაში ამ მასალის დაზიანებული ჯირკვლიდან აღებამ შესაძლოა ტულარემიის რეინფექცია გამოიწვიოს. ამიტომ დიაგნოსტიკისათვის ამ ტიპის მასალის აქტიური გამოყენება რეკომენდირებული არ არის.

✓ აუტოფსიური მასალა – ნიმუშები აბსცესებიდან, ლიმფური ჯირკვლებიდან, ფილტვებიდან, ღვიძლიდან, ელენთიდან, ცერებროსპინალური სითხიდან და ძვლის ტვინიდან.

✓ ძუძუმწოვრების შრატის (ან პლაზმის, ან ფილტრის ქაღალდზე აღებული სისხლის წვეთის) აღება ისევე, როგორც ადამიანის შემთხვევაში, ხდება ტულარემიის ნებისმიერი ფორმის დროს. შრატის პირველი პორციის აღება ხდება დაავადების ადრეულ პერიოდში, მეორე კი დაავადების გამოვლინებიდან 2-4 კვირის შემდეგ.

✓ ცხოველური ასპირატების აღება ხდება ჯირკვლებიდან და დაზიანებული ქსოვილებიდან წყლულოვან-გლანდულარული, გლანდულარული, ოროფარინგეალური ფორმების დროს.

✓ ცხოველური აუტოფსიური მასალა შეიძლება აღებული იყოს აბსცესებიდან, ლიმფური ჯირკვლებიდან, ფილტვებიდან, ღვიძლიდან, ელენთიდან, ძვლის ტვინიდან და ცერებროსპინალური სითხიდან.

✓ ტკიპების, რწყილებისა და კოლოების შეგროვების შემდეგ ხდება მათი დახარისხება და გაერთიანება სახეობებისა და შეგროვების ადგილის მიხედვით. ლაბორატორიაში მათი მიტანა ხდება ცოცხლად, ან გაყინულ (-80°C) მდგომარეობაში, რის შემდეგაც ხდება მათგან მომზადებული ემულსიების თეთრ თაგვებში ინოკულაცია, საკვებ არეზე გათესვა და მოლეკულური ანალიზი.

✓ გარემო ნიმუშების აღება (წყალი, ნიადაგი, მღრღნელების ექსკრემენტები) უნდა მოხდეს ეპიდემიოლოგიური კვლევის პარალელურად. ხოლო მათი შემდგომი დამუშავება საკვლევი მეთოდის სპეციფიკიდან გამომდინარე უნდა განისაზღვროს (WHO Guidelines on Tularemia, 2007).

სეროლოგიური ანალიზი ტულარემიის დამადასტურებელ მეთოდებს განეკუთვნება. ეს შესაძლებელია იყოს მინაზე აგლუტინაცია, მიკროაგლუტინაცია და აგლუტინაცია სინჯარაში. ბოლო დროს წარმატებით ხდება იმუნოფერმენტული პლატფორმის დანერგვა. ტულარემიის საწინააღმდეგო ანტისხეულების დეტექცია სისხლში შესაძლებელია ინფიცირებიდან 10-20 დღის შემდეგ.

F. tularensis კულტურის მიღება საბოლოო, დადასტურებული დიაგნოზის დასმის საშუალებას იძლევა. ბაქტერიოლოგიური კვლევისათვის აღებული კლინიკური ნიმუშების ტრანსპორტირება სასურველია აღებიდან მაქსიმუმ 24 სთ-ის განმავლობაში მოხდეს. უფრო გახანგრძლივებული ტრანსპორტირების შემთხვევაში ნიმუში მხოლოდ მოლეკულური დიაგნოსტიკისათვის გამოიყენება. კლინიკური მასალის პირველადი ინკუბაცია ცისტეინით გამდიდრებულ სისხლიან ან შოკოლადისებურ ნიადაგზე 35-37°C-ზე 7-10 დღის განმავლობაში ხდება.

სელექტიური ნიადაგები (1ლ CHAB აგარი ანტიბიოტიკებით: 7.5მგ კოლისტინი, 2.5მგ ამფოტერიცინი, 0.5მგ ლინკომიცინი, 4მგ ტრიმეტოპრიმი, 10მგ ამპიცილინი)

აქტიურად გამოიყენება პირდაპირი გათესვის გზით საველე ნიმუშებიდან კულტურის მისაღებად.

ბიოცდა, ანუ ინფექციური მასალის თაგვებში ინოკულაცია დღემდე ტულარემიის კულტურის მიღების ყველაზე საიმედო მეთოდებს განეკუთვნება. ლაბორატორიული თეთრი თაგვები ძლიერ სენსიტიურები არიან *F. tularensis* მიკრობის მიმართ - ლეთალური დოზა 1 მიკრობს შეადგენს (Jones R. M., et al. 2005). ისინი, როგორც წესი ინოკულაციიდან 3-4 დღეში კვდებიან. გაკვეთის შემდეგ გამდიდრებულ ნიადაგზე გათესილი ღვიძლისა და ელენთის ქსოვილების 48 სთ-იანი ინკუბაციის შედეგად მიიღება *F. tularensis* კულტურა.

ანტიგენის დეტექცია *F. tularensis* იზოლატის დადასტურებისათვის გამოიყენება. ანტიგენის აღმოჩენა შესაძლებელია როგორც კულტურაზე სპეციფიკური ანტისხეულების შემცველი შრატის დამატებით (აგლუტინაცია სასაგნე მინაზე), ასევე ფლუორესცენტულად მონიშნული მონოკლონალური ანტისხეულებით, ანუ პირდაპირი ფლუორესცენციის რეაქციით (DFA), რომელიც ინფიცირებულ ქსოვილებში მიკრობის აღმოჩენისათვისაც გამოიყენება.

F. tularensis მოლეკულური დიაგნოსტიკისათვის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (PCR) გამოიყენება (ცხრილი 1). იგი განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია არაკულტივირებადი ნიმუშების ტესტირებისათვის. გელ-ელექტროფორეზზე დამყარებული PCR ტესტების უმეტესობა გარე მემბრანის მკოდირებელი *fopA* და *tul4* გენების დეტექციისათვის გამოიყენებოდა (Fulop, Leslie & Titball, 1996; Sjöstedt et al., 1997; Higgins et al., 2000; Johansson et al., 2000a). ცოტა მოგვიანებით შემუშავებულმა real-time PCR მეთოდმა, რომელიც დეტექციას TaqMan ფლუორესცენტული ზონდების მეშვეობით ახდენს, გელ-ელექტროფორეზის PCR-თან შედარებით საგრძნობლად გაზარდა სპეციფიკურობა და მიკრობის დეტექციის შესაძლებლობა ისეთ ნიმუშებში, სადაც მიკროორგანიზმის რაოდენობა სავარაუდოდ ძალიან დაბალია. ამ ანალიზის სამიზნეებია *ISFtu2* ელემენტი, *23kDa* და *tul4* გენები (Versage et al., 2003; Kugeler et al., 2006). გარდა ამისა მიღებული იზოლატის იდენტიფიკაციისათვის შესაძლებელია რიბოსომული 16S rDNA თანამიმდევრობის უნივერსალური პრაიმერების, ხოლო

კონტამინირებული ნიმუშებისათვის – *Francisella* სპეციფიკური 16S rDNA პრაიმერების გამოყენება (Forsman M, et al., 1994).

ცხრილი - 1. PCR მეთოდით *F. tularensis* ქვესახეობების დადგენა (WHO Guidelines on Tularemia, 2007)

პრაიმერის ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობა (5' – 3')	პროდუქტის ზომა (bp)				
	<i>F. tularensis</i> ქვესახეობა				<i>F. philomoragia</i>
	<i>tul</i> ^a	<i>hol</i> ^b	<i>med</i> ^c	<i>nov</i> ^d	
Ft-M19 F:aggcggagatctaggaaccttt R:agcccaagctgactaaaatcttt	250	220	250	±250	na
ISFtu2 Tuf1705:gatagatacacgccttgctcaa; Tu B R431:accagccaatgcctaaata	390	1248	nt	390	na
pdpD-2 F:tggttattcaatggctcag R:tcttgcacagctccaagagt	280	na	nt	136*	nt
RD1 F:tttatataggtaaatgtttacctgtacca R:gccgagtttgatgctgaaaa	1522	924	1453	3322*	nt

^a *tularensis*.
^b *holarctica*.
^c *mediasiatica*.
^d *novicida*.

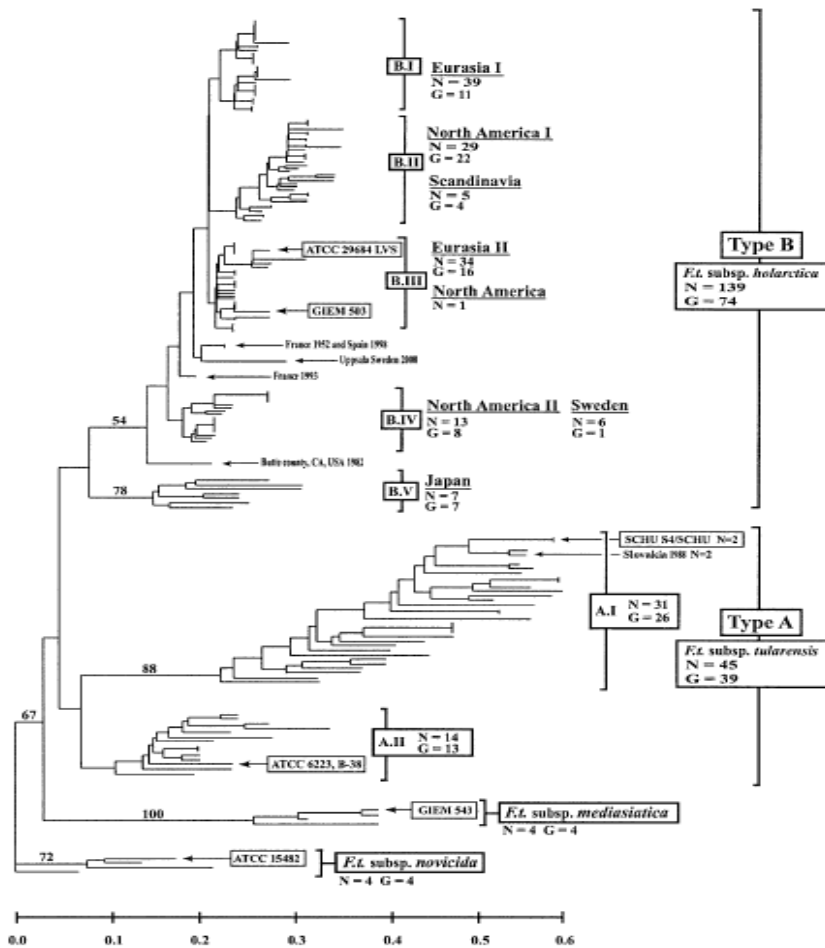
ხშირად *F. tularensis* ქვესახეობის დასადგენად ბიოქიმიური მახასიათებლები გამოიყენება (ცხრილი-2). ამას განსაკუთრებული მნიშვნელობა ჩრდილოეთ ამერიკის კონტინენტზე ენიჭება, სადაც ტულარემიის ორივე ქვესახეობაა გავრცელებული.

ცხრილი - 2. *F. tularensis* სახეობებისა და ქვესახეობების განმასხვავებელი მახასიათებლები (WHO Guid. on Tul., 2007)

ბიოქიმიური მახასიათებლები	<i>F. tularensis</i> ქვესახეობა				<i>F. philomoragia</i>
	<i>tularensis</i>	<i>holarctica</i>	<i>mediasiatica</i>	<i>novicida</i>	
Cysteine/cystine requirement	+	+	+	-	-
Carbohydrate fermentation:					
Maltose	+	+	-	weak	+
Sucrose	-	-	-	+	+
D-glucose	+	+	-	+	weak
Glycerol	+	-	+	weak	-
Citrulline ureidase production	+	-	+	+	nt
Oxidase production ^a	-	-	-	-	+
H ₂ S production on TSI	+				
Cell size (µm)	0.2–0.7x0.2	0.2–0.7x0.2	0.2–0.7x0.2	0.7x1.7	0.7x1.7

F. tularensis მოლეკულური სუბტიპირებისათვის რამოდენიმე მარკერი გამოიყენება. ესენია: რნმ ჰელიკაზას რეგიონი (Ft-M19), რომლის ამპლიფიკაციის შედეგად მიღებული დნმ ფრაგმენტის ზომის მიხედვით შესაძლებელია *F. tularensis* ქვესახეობის დადგენა; ჩართული *ISFtu2* თანამიმდევრობის არსებობა (*ISFtu2*); RD1 უბანი (Region of Difference 1); და *pdpD* გენი (*pdpD-2*) (Johansson et al., 2000c; Broekhuijsen et al., 2003; Johansson et al., 2004; Nano et al., 2004; Petersen et al., 2004a; Byström et al., 2005).

ტიპირების შემდეგი საფეხურია შტამებს შორის განსხვავების დაჭერა, რაც საშუალებას იძლევა თვალი გავადევნოთ იზოლატების წარმომავლობას, ან დავადგინოთ აფეთქების წყარო და ხელი შევუწყოთ ეპიდემიოლოგიურ კვლევას. ტიპირების ასეთ მეთოდს *F. tularensis* შტამებისათვის განეკუთვნება მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი (MLVA), რომელიც გენომში გარკვეული განმეორებითი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების რაოდენობის დადგენაზეა დაფუძნებული. ეს მეთოდი შტამებს შორის ყველაზე მაღალი გარჩევადობის უნარით ხასიათდება და *F. tularensis* ქვესახეობების კლასიფიკაციის, პოპულაციის სტრუქტურისა და ნაწილობრივ ფილოგენეტიკური კავშირების სურათს იძლევა (Johansson et al., 2004). იგი შემუშავებულ იქნა ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტისა (NAU) და შვედეთის თავდაცვის კვლევითი სააგენტოს (FOI) ერთობლივი კოლაბორაციით. ამ მეთოდის მეშვეობით



სურათი 5. მსოფლიოში გავრცელებული *F. tularensis* შტამების MLVA-25 ტიპირების შედეგად მიღებული ფილოგენეტიკური ხე. (Johansson et al., 2004)

F. tularensis შტამების MLVA ანალიზმა აჩვენა, რომ *F. tularensis* ქვეტიპი *tularensis* უფრო მეტ გენეტიკურ განსხვავებებს იძლევა, ვიდრე *F. tularensis* ქვეტიპი *holarctica*, რამაც მის უფრო ხანგრძლივ ევოლუციურ ასაკზე მიუთითა. გარდა ამისა აშშ-ში გავრცელებული *F. tularensis* ქვეტიპი *tularensis* შიგნით დადგინდა ორი დამოუკიდებელი ჯგუფის არსებობა (Johansson et al., 2004), რომელთაგან ერთერთი მეტწილად აშშ-ს აღმოსავლეთში იყო გავრცელებული, ხოლო მეორე დასავლეთში. მათ პირობითად A.I და A.II ქვეტიპები ეწოდათ (სურ. 5).

F. tularensis ტიპი A პოპულაციაში ორი დამოუკიდებელი სუბპოპულაციის დადგენა MLVA მეთოდის გამოყენებამდე, პულსირებადი ველში გელ-ელექტროფორეზის (PFGE) მეშვეობითაც გახდა შესაძლებელი. PFGE და ეპიდემიოლოგიური მონაცემების შეჯერებით დადგინდა, რომ აშშ დასავლეთში გავრცელებული A ტიპის *F. tularensis* მიერ გამოწვეული დაავადების კლინიკური მიმდინარეობა ნაკლებად მძიმედ მიმდინარეობს, ვიდრე აღმოსავლეთის A ტიპის მიერ გამოწვეული ინფექციები (Staples et al., 2006). ამასთან ისეთი ნატიფი მოლეკულური მეთოდების გამოყენებით, როგორებიცაა PFGE (Staples, J. E., 2006) და MLVA (Farlow J., 2005, Johansson A., 2004) ცხადი გახდა, რომ A.I და A.II სუბპოპულაციები შიდა გენეტიკური ვარიაციების სიმრავლით გამოირჩევიან. ამის საპირისპიროდ აღმოჩნდა, რომ *F. tularensis* ქვეტიპი *holarctica* ნაკლები გენეტიკური მრავალფეროვნებით ხასითდება. ამ თვისებისა და *F. tularensis holarctica*-ს ფართე გეოგრაფიული გავრცელების შეჯერებით რამოდენიმე ავტორი დამოუკიდებლად მივიდა იმ დასკვნამდე, რომ A ტიპის *F. tularensis* განშტოებამ არც ისე დიდი ხნის წინ განიცადა ძლიერი მუტაცია, რომელმაც ჯერ პოპულაციის მკვეთრი რაოდენობრივი შემცირება, შემდეგ კი მნიშვნელოვანი გენეტიკური ცვლილებები, ქვესახეობის ძირითადი შტოდან დაცილება, ახალ გარემოსთან შეგუების გაუმჯობესებული უნარი და შემდეგ მთელ ჩრდილოეთ ნახევარსფეროში გავრცელება გამოიწვია. (Dempsey, 2006, Farlow, J., 2005, Johansson, 2004, Keim, P., 2007). ამ მოვლენას ე.წ “ბოთლის ყელის” ეფექტი დაერქვა.

MLVA-25 სისტემის გამოქვეყნების შემდეგ ეს მეთოდიკა მრავალ ქვეყანაში იქნა აპრობირებული ტულარემიის გამომწვევის ტიპირებისათვის. ასე მაგალითად,

თურქეთში ტულარემიის აფეთქების დროს პაციენტებიდან მიღებული იყო ორი კულტურა, რომლებიც ბულგარეთში 4 კლინიკური და 3 გარემო ნიმუშიდან იზოლირებულ შტამთან ერთად იყო შესწავლილი. MLVA ტიპირება ჩატარდა 6 VNTR მარკერის გამოყენებით: Ft-M3, Ft-M6, Ft-M20, Ft-M21, Ft-M22, Ft-M24. კვლევის შედეგად ორ თურქულ და ორ ბულგარულ კლინიკურ შტამებს იდენტური პროფილი აღმოაჩნდათ, რითიც აფეთქებების საერთო წყაროს არსებობის ვარაუდი გამოითქვა, რაც თავისუფლად იყო შესაძლებელი ამ ორ ქვეყანას შორის მჭიდრო ეკონომიური და ტურისტული ურთიერთობების გათვალისწინებით (Gurcan S. et al, 2008).

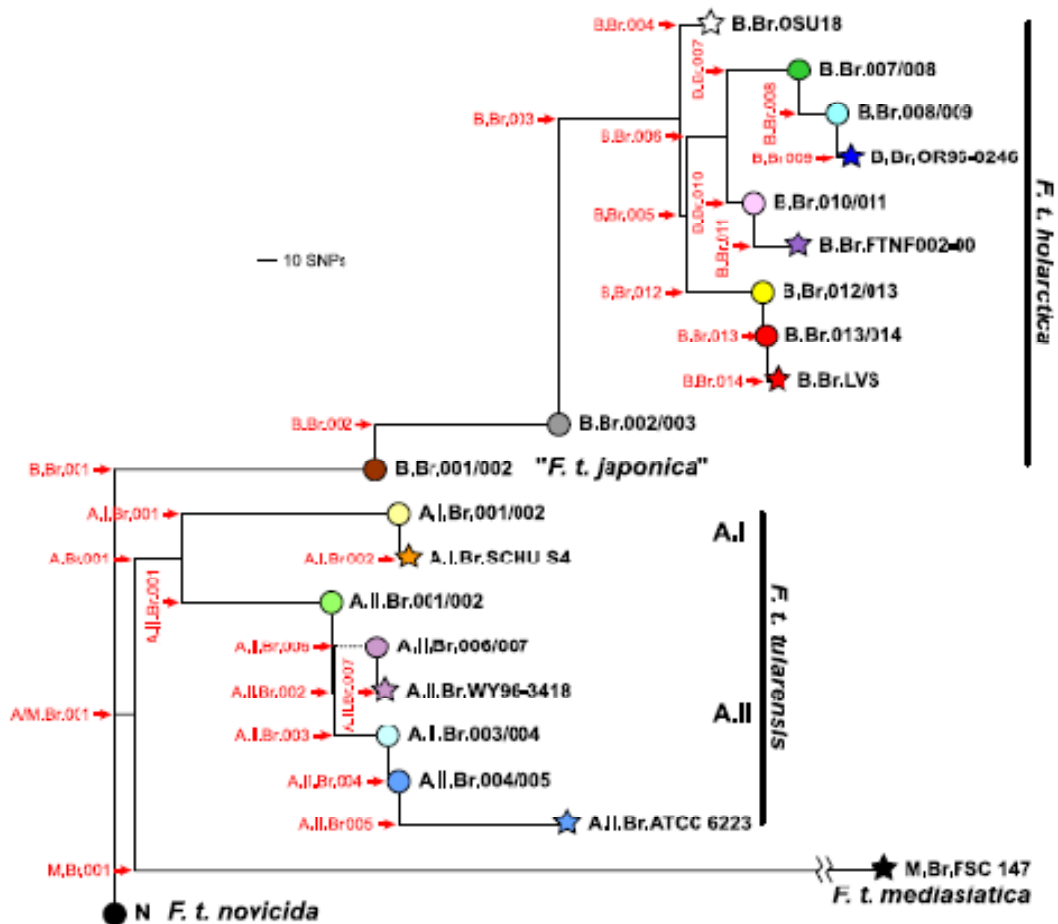
რუსეთის ფედერაციის დონის როსტოვის შავი ჭირის საწინააღმდეგო კვლევითი ინსტიტუტის კოლექციაში არსებული შტამების MLVA ტიპირებისათვის შერჩეული იყო ოთხი VNTR მარკერი: FtA (VNTR თანმიმდევრობა AATAAGGAT), რომელსაც MLVA-25 სისტემაში Ft-M3 შეესაბამება; FtB (VNTR თანმიმდევრობა TTTCTACAAATATCTT), ანუ იგივე Ft-M10; FtC (VNTR თანმიმდევრობა TTGGTGAACCTTCTTGCTCTT), იგივე Ft-M6; და FtD (VNTR თანმიმდევრობა TTAATG), რომელიც Ft-M18 VNTR მარკერის შებრუნებული თანმიმდევრობის ვარიანტია (Vodop'yanov A., et al., 2007). შედეგის წაკითხვა კაპილარული ფორეზის ნაცვლად აკრილამიდის გელზე ხდებოდა. ევროპის რამოდენიმე ქვეყნისა და ყოფილი საბჭოთა კავშირის ტერიტორიაზე 1988-89 წლების ეპიზოტის დროს იზოლირებული 159 შტამის ტიპირების შედეგად გამოვლინდა *F. tularensis* 30 განსხვავებული MLVA გენოტიპი, რომლებიც 7 კლასტერში გადანაწილდა.

2009 წელს შემუშავებულ იქნა გამარტივებული მულტიპლექსური MLVA-11 სისტემა, რომელშიც მოხდა ყველაზე ვარიაბელური მარკერების შერჩევა (Ft-M02, Ft-M03, Ft-M04, Ft-M05, Ft-M06, Ft-M10, Ft-M20, Ft-M22, Ft-M23 და Ft-M24) და გაერთიანება სამ მულტიპლექსურ და ორ დამოუკიდებელ რეაქციაში, რომლებიც ამპლიფიკაციის შემდეგ სამ ნარევიში ნაწილდებოდა და იდგმებოდა კაპილარულ ელექტროფორეზზე (Vogler et al. 2009a).

დღეისათვის MLVA *F. tularensis* შტამებს შორის მრავალფეროვნების აღმოჩენის ერთერთი საუკეთესო მეთოდია. იგი სხვა მეთოდებთან შედარებით ერთერთი ყველაზე მაღალი დათიშვის, ანუ გარჩევადობის უნარით გამოირჩევა და მაღალ-კონსერვატიული *F. tularensis* განსაკუთრებით კი ქვესახეობის *holarctica* ტიპირების ერთერთი საუკეთესო საშუალებაა. თუმცა შტამების ევოლუციური პროცესის შესწავლის, ანუ მისი ფილოგენეტიკური ანალიზისათვის ამგვარი მრავალფეროვნება შესაძლოა ხელისშემშლელიც აღმოჩნდეს. ამ ეტაპზე ხშირად თავს იჩენს ე.წ. ჰომოპლაზია, მოვლენა, რომლის დროსაც ფილოგენეტიკურად ახლოს მდგომ შტამებს შესაძლოა საკმაოდ განსხვავებული MLVA პროფილები ჰქონდეთ, და პირიქით, ერთმანეთისაგან ფრიად დაშორებული და ამავდროულად მსგავსი ევოლუციური წარსულის მქონე შტამები მხოლოდ MLVA ტიპირებაზე დაყრდნობით შესაძლებელია ერთ ან ახლო მდგომ ჯგუფებში მოხვდნენ. (Keim, P., et al. 2004)

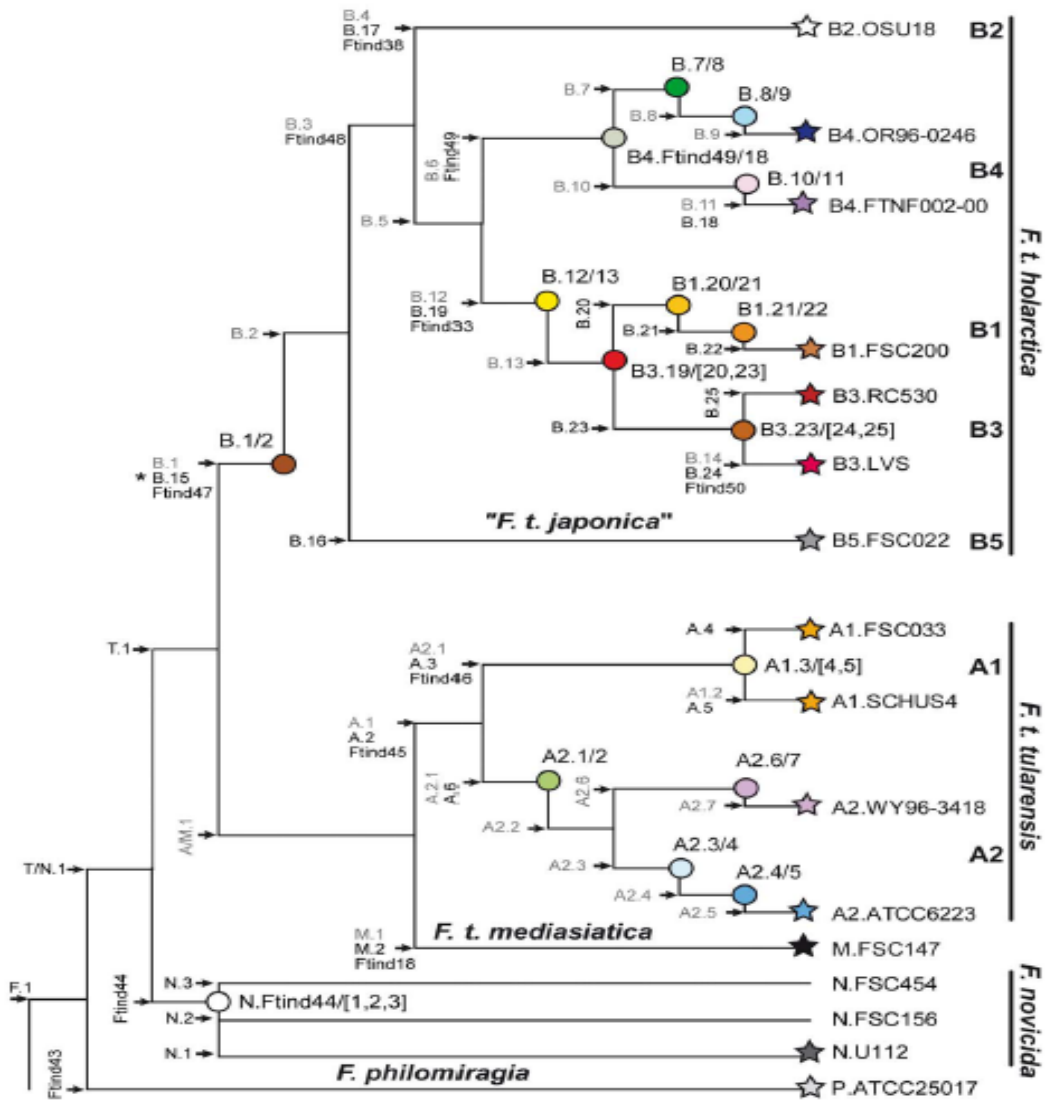
სწორედ ამიტომ, სხვადასხვა პათოგენების პოპულაციის სტრუქტურის უფრო ღრმა ანალიზისა და მისი გლობალური გავრცელების ისტორიული პროცესზე დაკვირვების მიზნით გამოიყენება ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის (SNP) აღმოჩენის მეთოდი, რომლის დასახვეწად NAU-ს მეცნიერთა ჯგუფმა *F. tularensis* SNP ანალიზი სამ-ეტაპად ჩაატარა (Vogler et al. 2009b). თავდაპირველად მოხდა *F. tularensis* 13 შტამის სრული გენომური თანმიმდევრობის ერთმანეთთან შედარება. ამისათვის შერჩეული იყო *Francisella tularensis* სხვადასხვა ქვესახეობების შტამები. კერძოდ, *F. tularensis* ქვესახეობისთვის *holarctica* შერჩეული იყო LVS, FTNF002-00, OSU18, OR96-0246, 257, FSC 200, FSC 022, *F. tularensis* ქვესახეობისთვის *tularensis* – SCHU S4, FSC 033, ATCC 6223, WY96-3418, *F. tularensis* ქვესახეობისთვის *mediasiatica* – FSC 147, and *F. tularensis* ქვესახეობისთვის *novicida* – U112. ამ 13 შტამის გენომების შედარების შედეგად აღმოჩენილ და ამორჩეულ იქნა 29,774 SNP ლოკუსი. აქედან 1,655 SNP გამოყენებული იყო მაღალი გარჩევადობის მიკროარეების დიზაინისათვის, რომელთა მეშვეობითაც თავის მხრივ გენოტიპირებული იყო სხვადასხვა ქვესახეობებისა და განსხვავებული გეოგრაფიული არეალის მქონე 95 *F. tularensis* შტამი. მიღებული მონაცემების საფუძველზე აიგო დიდი სიზუსტის ფილოგენეტიკური ხე (სურ. 6) და თითოეული

მიღებული ქვეჯგუფისათვის მოხდა თითო სპეციფიკური SNP ლოკუსის არჩევა, რომელთა ბაზაზე შეიქმნა 23 კანონიკური SNP ტესტი, რომლებიც გამოყენებული იყო 496 გენეტიკურად და გეოგრაფიულად განსხვავებული *F. tularensis* შტამის ტიპირებისა და ქვეჯგუფების შიგნით დამატებითი ფილოგენეტიკური სტრუქტურის განსაზღვრისათვის (Vogler et al. 2009b).



სურათი 6. 1655 SNP ლოკუსით დიზაინირებული მიკროჩიპებით ტიპირებული 95 შტამის შედარებით აგებული *F. tularensis* ფილოგენეტიკური ხე (Vogler et al. 2009b).

ამიტომ, ახალი იზოლირებული *F. tularensis* შტამების თავდაპირველი ტიპირება რეკომენდირებულია SNP კანონიკური მარკერების გამოყენებით. ხოლო გლობალურ SNP ფილოგენეტიკურ ხეზე განთავსების შემდეგ MLVA მარკერები შტამებს შორის დეფერენცირებას მოახდენენ. ამასთან, SNP და MLVA მარკერების ერთობლივი გამოყენებით შესაძლებელია გენომის სექვენირებისა და ახალი SNP ლოკუსების აღმოჩენისათვის საინტერესო შტამების გამოვლენა.



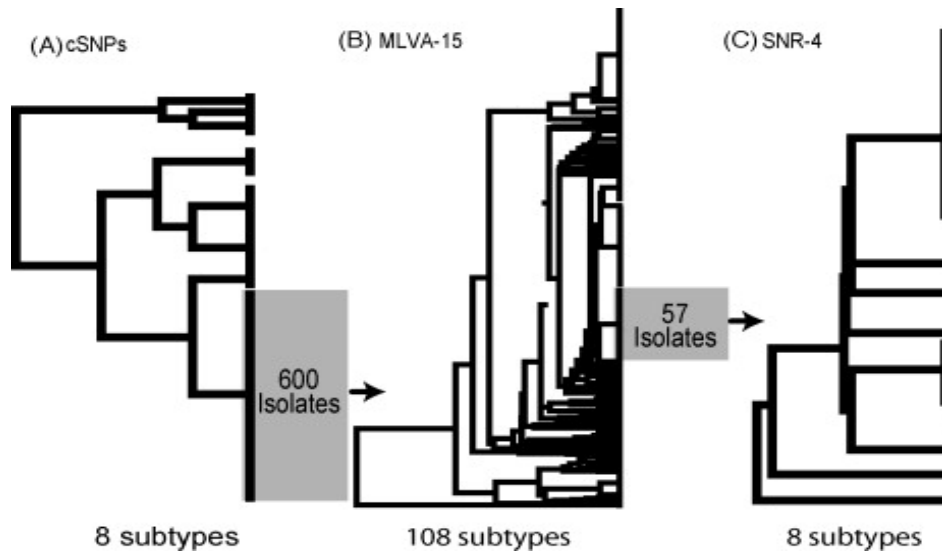
სურათი 7. INDEL და SNP მარკერებით ტიპირებული შტამების შედარებით აგებული *F. tularensis* ფილოგენეტიკური ხე (Svensson K, et al., 2009)

SNP მსგავსი ფილოგენეტიკური იარაღია ინსერციებისა და დელეციების (INDELs) დეტექციის მეთოდი, რომლებიც შვედი მეცნიერების მიერ იქნა აღწერილი და შემუშავებული (Svensson K, et al. 2005; Larsson P, et al. 2007). INDEL ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობებია, რომლებსაც მიკრობი ევოლუციური პროცესის განმავლობაში კარგავს. მეთოდის არსი გენომის ამ უბნების დეტექციასა და ამით შტამის ფილოგენეტიკური ასაკის დადგენაში მდგომარეობს.

ამ მეთოდის საფუძველზე კანონიკური INDEL და SNP მარკერების კომბინაციით მოხდა real-time PCR ტესტების შემუშავება (Svensson K, et al., 2009) და *F. tularensis*

შტამების ტიპირება. მიღებული ფილოგენეტიკური ხე (სურ. 7) პრაქტიკულად იმეორებს NAU-ში ჩატარებული SNP ტიპირების სტრუქტურას (სურ. 6).

სხვადასხვა მეთოდების იერარქიული გამოყენების ერთერთი თვალსაჩინო მაგალითია *Bacillus anthracis* შტამებზე NAU-ში ჩატარებული კვლევა (Keim P, et al, 2004).



სურათი 8. SNP, MLVA და SNR მეთოდების შედარება *B. anthracis* შტამების მაგალითზე (Keim P, et al, 2004)

სამი მეთოდის შედარების შედეგად ასეთი სურათი გამოიკვეთა: (A) *B. anthracis* 1067 შტამი 8 SNP მარკერით ტიპირების შემდეგ გადანაწილდა 8 ფილოგენეტიკურ ჯგუფში, (B) ყველაზე დიდი SNP ჯგუფის (600 შტამი) MLVA-15 ტიპირებით 108 ჯგუფი გამოიკვეთა, (C) MLVA-ზე უფრო მაღალი დიფერენცირების უნარის მქონე ერთეული ნუკლეოტიდური განმეორებების (SNR) მეთოდი გამოყენებული იყო ერთერთი MLVA გენოტიპის (57 შტამი) ანალიზისათვის, რის შედეგადაც გამოვლინდა 8 დამატებითი ქვეტიპი (სურ. 8).

რამოდენიმე მოლეკულური მეთოდის წარმატებით გამოყენების შედეგად ფარდა აეხადა ერთერთ ყველაზე გახმაურებულ შემთხვევას, რომლის დროსაც XX საუკუნის 80-იან წლებში ევროპაში, კერძოდ სლოვაკიასა და ავსტრიაში გარემოდან აღებულ სინჯებში (რწყილები, გამაზისებური ტკიპები) იდენტიფიცირებული იყო *F. tularensis* ქვესახეობა *tularensis* (A ტიპი) რამოდენიმე შტამი (Gurycová D., 1998). ამ მოვლენამ მრავალი მითქმა-

მოთქმა გამოიწვია. გაჟღერდა ასევე ვარაუდი, რომ იუგოსლავიის ომის დროს ადგილი ჰქონდა ბიოლოგიური იარაღის გამოყენებას. მეორე თეორიის მიხედვით ევროპის კონტინენტს A ტიპის ტულარემიის გავრცელებას უწინასწარმეტყველებდნენ. თუმცა ამ შტამებიდან ერთერთის (FSC198) გენომის სექვენირების შემდეგ აღმოჩნდა რომ ის პრაქტიკულად ლაბორატორიული შტამის SCHU-S4 იდენტური იყო (Chaudhuri RR, et al, 2007). კიდევ ორი შტამის შერჩეული უბნების სექვენირებამაც იდენტური შედეგები აჩვენა. ამრიგად, დადასტურდა მოსაზრება, რომ *F. tularensis* ქვესახეობა *tularensis* ევროპის კონტინენტზე ბუნებაში არ არსებობს და რომ ადგილი ჰქონდა ლაბორატორიული შტამის ანთროპოგენულ გავრცელებას ვექტორების ან უშუალოდ იზოლატების გადაადგილების გზით. თუმცა აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ შუაგულ ევროპაში A ტიპის *F. tularensis* ბუნებრივ პირობებში თავის შენარჩუნების ფაქტი, განსაკუთრებით ამ პათოგენის მაღალი ვირულენტურობის გათვალისწინებით, საკმარის პრობლემას უქმნის საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის სფეროს.

ცოტა მოგვიანებით ქ. უმეოში შვედეთის თავდაცვის კვლევითი სააგენტოს (FOI) ლაბორატორიის მეცნიერების მიერ ჩატარდა კვლევა, რომლის მიზანი სლოვაკიაში გამოყოფილი FSC198 და მათსავე ლაბორატორიაში არსებული ატენუირებული ვირულენტობის მქონე FSC0043 *F. tularensis* ქვესახეობა *tularensis* შტამების გენომის შედარება ორივე მათგანის სავარაუდო წინაპარ SCHU-S4 შტამთან (Sjödín A, et al, 2010). ამ შტამების გენომების სრულად სექვენირებისა და SCHU-S4 შტამთან შედარების შემდეგ ნანახი იყო გარკვეული განსხვავებები. კერძოდ, FSC0043 შტამს, რომელიც ლაბორატორიულ პირობებში მუდმივად მრავლდებოდა ხელოვნურ ნიადაგზე, ოთხი INDEL ცვლილება აღმოაჩნდა. სამი მათგანი (Ftind51, Ftin52, Ftin53) პატარა (2 bp, 1 bp, და 1 bp), ხოლო მეოთხე (RD18) წინა კვლევებში (Svensson K, et al, 2005) აღწერილი 1,480 bp ზომის დელეციები იყო. Ftind51 მუტაცია აზიანებს რკინის ტრანსპორტერი ცილის მაკოდირებელ გენს (FTT0615), Ftind52 და Ftind53 ლოკალიზებულები არიან *Francisella* პათოგენურობის კუნძულის pdpC გენის ორივე ასლში, ხოლო RD18 დელეცია მონაწილეობს რკინის უტილიზაციაში (Lindgren H, et al, 2009) და მნიშვნელოვან როლს ასრულებს როგორც SCHU-S4 (Twine SM, et al, 2006), ასევე ცოცხალი ვაქცინალური

შტამის (Salomonsson E, et al, 2009) ვირულენტობის მექანიზმში. ამავდროულად, FSC0043 შტამი SNP და VNTR ლოკუსების მიხედვით რეფერენსული შტამის იდენტური იყო.

ამ შედეგის საპირისპიროდ, FSC198 შტამს, რომელიც გარკვეული პერიოდის განმავლობაში ბუნებრივ პირობებში მრავლდებოდა, ჰქონდა რვა SNP (S1-S8) და სამი VNTR (Ft-M3, Ft-M8, Ft-M10) ლოკუსის ცვლილება (Chaudhuri RR, et al, 2007) და არცერთი INDEL დელეცია SCHU-S4 შტამთან შედარებით. ამასთან, რვავე SNP ინტრაგენური არასინონიმური მუტაცია იყო და ვირულენტობის გენებს აზიანებდა.

ამ აღმოჩენამ გამოავლინა გარკვეული კორელაცია ბაქტერიული ორგანიზმების ზრდის პირობებსა და შექმნილი მუტაციების ტიპებს შორის. ამ მოსაზრების დამტკიცებას მომავალში დამატებითი კვლევების ჩატარება დასჭირდება, თუმცა უკვე შესაძლებელია ითქვას, რომ ეს ინფორმაცია სასარგებლო იქნება უცნობი შტამის წარმომავლობის განსაზღვრის პროცესში.

ყოველდღიურად მატულობს ახალი თაობის სექვენატორების შესაძლებლობები და შესაბამისად წარმოუდგენელი სისწრაფით მატულობს მოპოვებული ინფორმაციის რაოდენობა. ორიოდ სიტყვით მინდა შევხუ კვლევას, რომელიც ბაქტერიული პათოგენების შესწავლაში გენომის სექვენირების გამოყენების ერთ-ერთი საუკეთესო მაგალითია (Rohmer L., et al., 2007).

ცნობილია, რომ *Francisella tularensis* ქვესახეობები *tularensis* და *holarctica* ადამიანებისათვის პათოგენურ მიკროორგანიზმებს განეკუთვნებიან, ხოლო *F. tularensis novicida* მხოლოდ იმუნოდეფიციტურ პაციენტებსა და ლაბორატორიულ თაგვებში შეუძლია დაავადების გამოწვევა. სხვადასხვა მეთოდების წყალობით ნაჩვენები იყო, რომ ქვესახეობას *novicida* გაცილებით დიდი ევოლუციური ასაკი გააჩნა, ვიდრე ორივე პათოგენურ ქვესახეობას (Vogler et al. 2009b, Svensson K, et al., 2009). ცნობილია ისიც, რომ *novicida* გენომი (1,910,031) გაცილებით დიდია ვიდრე მაღალპათოგენური *F. tularensis tularensis* (1,892,819) და ნაკლებ პათოგენური *F. tularensis holarctica* გენომები (1,895,998). ამ სამი ქვესახეობის წარმომადგენელი შტამების (*novicida* - U112, *tularensis* - SchuS4 და *holarctica* - LVS) გენომების ერთმანეთთან შედარებით გამოვლინდა პათოგენურობასთან

ასოცირებული მრავალი გენი და ფსევდოგენი, რომელთა რაოდენობა გაცილებით მეტია პათოგენურ ქვესახეობებში (U112-14; SchuS4-254; LVS-303).

არაპათოგენურიდან პათოგენური შტამების ჩამოყალიბების ევოლუციურ პროცესში ქრონოლოგიური თანმიმდევრობით ჰქონდა ადგილი ჩართული ელემენტებით (IS) გამოწვეულ გენომურ გადაადგილებებს, წერტილოვან მუტაციებსა (SNP) და პატარა დელეციებს (INDEL). მაგალითად, IS ელემენტების რაოდენობა გაცილებით მეტია პათოგენურ შტამებში (ISFtu1: U112 – 1; SchuS4 – 53; LVS - 59).

გარდა ამისა, U112 და SchuS4 გენომებში გამოვლინდა ერთნაირი შემადგენლობისა და განლაგების გენების შემცველი 59 ქრომოსომული სეგმენტი, რომლებიც ამავდროულად გენომებში განსხვავებულად იყო გადანაწილებული. ანალოგიურად, U112 და LVS გენომების ერთმანეთთან შედარებით ისევ 59 იდენტური შემადგენლობის და გენომში განსხვავებული განაწილების სეგმენტია. ხოლო, ამ 59 სეგმენტის 47% (29 სეგმენტი) სრულიად იდენტურია SchuS4 და LVS შტამებში. შედეგი იმაზე მეტყველებს, რომ ეს უბნები ამ ორი ქვეტიპის ერთმანეთისაგან დათიშვამდე გაჩნდა და მხოლოდ მერე განვითარდა დამოუკიდებლად, ორი განსხვავებული მიმართულებით.

U112, SchuS4 და LVS გენომების ერთმანეთთან შედარების საფუძველზე გამოითქვა მოსაზრება, რომ ფსევდოგენების ფორმირებამ წამყვანი როლი ითამაშა გენეტიკური დრიფტის ჩამოყალიბებაში. ამასთან, IS ტრანსპოზონების გადაადგილებისა და ნუკლეოტუდური ცვლილებების შედეგად ზიანდებოდა ან სრულიად ითიშებოდა ფუნქციური გენები, რასაც მიკროორგანიზმების პოპულაცია ახალ, ევოლუციური მნიშვნელობის მქონე მუტაციამდე მიჰყავდა. ანუ, ფუნქციის შექმნა ან დაკარგვა, რომელსაც რამოდენიმე ბაქტერიაში ჰქონდა ადგილი, ხელს უწყობს ახალ პირობებთან უკეთეს შეგუებას, ანუ ე.წ. პათოადაპტაციას. შედეგად ვიღებთ ბოთლის ყელის ეფექტს, რომლის შემდეგ წარმოიქმნება სრულიად ახალი ვირულენტური პოპულაცია, რომელიც უკეთ ეგუება ახალ გარემოს და შეუფერხებლად იწყებს გავრცელებას.

Francisella გენომის სტრუქტურის სხვა მაღალპათოგენურ ბაქტერიებთან მსგავსების გამო, ევოლუციური ცვლილებების ამგვარი სცენარი სხვა ფაკულტატურ თუ ობლიგატურ უჯრედშიდა პათოგენებზეც შეიძლება იქნას მისადაგებული.

პრობლემის აქტუალობა

ტულარემია საქართველოში

საქართველოში ტულარემიის შემთხვევა პირველად 1946 წელს, ახალქალაქის რაიონის სოფ. კარძახის სასაზღვრო ჯარის ნაწილში დაფიქსირდა. აფეთქების კვლევაში მაშინდელი შავი ჭირის საწინააღმდეგო სადგურის თანამშრომლები ჩაერთნენ. რვა ჰოსპიტალიზირებულ სამხედრო მოსამსახურეს მაშინდელი კლასიფიკაციის მიხედვით ტიფოიდური ტულარემიის დიაგნოზი დაესვა. კიდევ 10 მესაზღვრეს სეროლოგიურ გამოკვლევაზე დადებითი პასუხი და შედარებით მსუბუქი კლინიკური ნიშნები აღმოაჩნდა. სოფ. კარძახის მოსახლეობის სეროლოგიური გამოკვლევის შემდეგ ტულარემიის სხვა შემთხვევებიც დაფიქსირდა. ტულარემიის მიკრობის გამოყოფა ჩვეულებრივი მემინდვრისა და სახლის თაგვიდან მოხერხდა (70). აფეთქების მიზეზად ალიმენტარული გზა დასახელდა. თუმცა მოგვიანებით გაკეთებული ანალიზის საფუძველზე გამოითქვა ვარაუდი, რომ ეს იყო თორაკალური ტულარემიის აფეთქება, რომელიც აგრარულ საქმიანობას, კერძოდ კი ინფიცირებული მემინდვრებით დაბინძურებული თივისა და სოფლის მეურნეობის სხვა პროდუქტების გადამუშავებას უკავშირდებოდა (Velijanashvili I, 1992).

მოგვიანებით, 1947-48 წლებში, ჯავახეთის ტერიტორიაზე მოსახლეობის სეროლოგიური გამოკვლევით დადგინდა, რომ ეს ინფექცია საკმაოდ ფართოდ იყო გავრცელებული. 1959-85 წლებში ტულარემიის მიკრობი მუდმივად გამოიყოფოდა მღრღნელებისაგან და ექტოპარაზიტებისაგან. ხოლო 1976-78 წლებში ჩვეულებრივი მემინდვრების განსაკუთრებით დიდ ეპიზოოტიას ჰქონდა ადგილი.

რეგიონში შავი ჭირის საწინააღმდეგო სადგურმა სისტემატიური დაკვირვებები დაიწყო. სამსახური ამ სახელით 1991 წლამდე არსებობდა. 1992 წლიდან მას განსაკუთრებით საშიში ინფექციების საწინააღმდეგო სამეცნიერო პრაქტიკული ცენტრი დაერქვა. ხოლო 1996 წლიდან იგი დაავადებათა კონტროლის ეროვნული ცენტრის სახელით აგრძელებს მუშაობას. დღეს ამ სამსახურს ლ. საყვარელიძის სახელობის საქართველოს დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის

ეროვნული ცენტრის (დკსჯეც) სახელით იცნობენ. თავისი 85-წლიანი არსებობის მანძილზე სამსახური მუდმივად აწარმოებდა მონიტორინგს განსაკუთრებით საშიში ინფექციების, მათ შორის ტულარემიის ბუნებრივ კერებზე. კარმაზის აფეთქების შემდეგ საქართველოს ტერიტორიაზე ტულარემიის რამოდენიმე დიდ აფეთქებასა და მთელ რიგ სპორადულ შემთხვევებს ჰქონდათ ადგილი.

- 1955 წ. – ასპინძის რაიონის ს. ხერთვისი და ახალქალაქის რაიონის ს. ზაკი და ს. გომანი - დაფიქსირდა ტულარემიის ანგიო-ბუბონური შემთხვევები.
- 1956 წ. – ს. არხილოსკალო, დედოფლისწყაროს (ყოფილი წითელიწყაროს) რ-ნი, ანგიო-ბუბონური ტულარემიის აფეთქება მღრღნელების განადგურების სამუშაოებში ჩართულ სკოლის მოსწავლეებს შორის (Klimukhina M., et al. 1959); ინფიცირება სავარაუდოდ ალიმენტარული გზით მოხდა - დაბინძურებული ხელებით საკვების მიღების დროს. ამ შემთხვევის შემდეგ გამოითქვა მოსაზრება, რომ აღმოსავლეთ საქართველოში, კერძოდ შირაქისა და ელდარის ველებზე, არსებობდა ტულარემიის დამოუკიდებელი ბუნებრივი კერა (Akhundov M., 1969, Gusev V., et al. 1959, Jabrailov D., 1971). ამის დამადასტურებელი ისიც, რომ 1957-60 წწ. – ქ.თბილისის შემოგარენში (მცხეთისა და გარდაბნის რაიონები) ჩვეულებრივი მემინდვრიას რაოდენობის მკვეთრი მომატების გამო ადგილი ჰქონდა ტულარემიის ეპიზოტას (Klimukhina M., et al. 1963), ხოლო 1958 წელს ბოლნისის რაიონში დაჭერილი რუხი ვირთაგვიდან (*Ratus norvegicus*) გამოიყო ტულარემიის კულტურა. ოთხწლიანი დაკვირვებებით დადგინდა რომ დაავადების გადატანაში მიკრობის მიმართ მგრძობიარე რამოდენიმე სახეობის მღრღნელები და ექტოპარაზიტები მონაწილეობდნენ.
- 1973 წ. – ს. ხეთაგუროვი, ცხინვალის რ-ნი, ტულარემიის ბუბონური ფორმის შემთხვევები. ინფიცირება მოხდა ტკიპებისაგან (*Haemaphysalis otophila*) ცხვრების გაწმენდის დროს. მოგვიანებით დადასტურდა, რომ ცენტრალური კავკასიონის სამხრეთ კალთების მიმდებარე დაბლობი მთლიანად ტულარემიის ბუნებრივი კერა იყო (Rudnev M., et al. 1978).
- 1984 წლის იანვარ-თებერვალში ადგილი ჰქონდა საქართველოში ტულარემიის ყველაზე დიდ ეპიდაფეთქებას ნინოწმინდის (ყოფილი ბოგდანოვკის) რაიონის სოფელ

განმაში. ოფიციალურად რეგისტრირებული იყო 277 შემთხვევა, აქედან ტულარინის სინჯზე დადებით 12 ადამიანს სავარაუდოდ ინფექცია ძველი გადატანილი ჰქონდა. აფეთქება გამოხატული იყო სხვადასხვა და შერეული კლინიკური ფორმებით, მოიცავდა პრაქტიკულად ყველა ასაკობრივ ჯგუფს, თუმცა მეტი წილი სკოლამდელ და სასკოლო ასაკის ბავშვებზე მოდიოდა. შემთხვევები არ ჭარბობდა მამაკაცებში, შესაბამისად არ უკავშირდებოდა რომელიმე პროფესიულ საქმიანობას. ამასთან დაავადებების შემთხვევებს ადგილი არ ჰქონია სოფლის ჩრდილოეთ ნაწილში, სადაც მოსახლეობა წყაროს წყლებით მარაგდებოდა. სამაგიეროდ შემთხვევები დაფიქსირებული იყო რეზერვუარის პირველივე განშტოებაში. ყოველივე ზემოთქმულის გათვალისწინებით დადგინდა, რომ დაბინძურებული იყო სოფლის წყალმომარაგების მთავარი რეზერვუარი და წყალსაქაჩი. ამ დასკვნას ადასტურებდა ის ფაქტიც, რომ აფეთქებას წინ უძღოდა ეპიზოოტია ჩვეულებრივ მემინდვრებში, ხოლო წყლის მომარაგების სისტემის ქლორირება დიდი ხნის განმავლობაში არ იყო ჩატარებული (Velijanashvili I, 1992).

- 1997 წელს ქარელის რაიონის სოფ. რუისში გამოვლინდა 6 ანგიო-ბუბონური შემთხვევა, რომლებიც მღრღნელების მიერ დაბინძურებული ხორბლის გაცხრილვის, ან გარეცხვის შედეგად ჩამოყალიბდა;
- 1998 წ. – დარეგისტრირდა 2 ანგიო-ბუბონური შემთხვევა;
- 2005 წ. – ს. თამარაშენი, ქარელის რ-ნი, დაფიქსირდა ტულარემიის 3 შემთხვევა – 1 მენინგიტური და 2 ბუბონური;
- 2006 წლის გაზაფხულზე კახეთის რეგიონში, ს. ფშაველში გამოვლინდა



სურათი 9. ტულარემიის აფეთქების ფოტომასალა, კასპი, სოფ. ზემო რენე

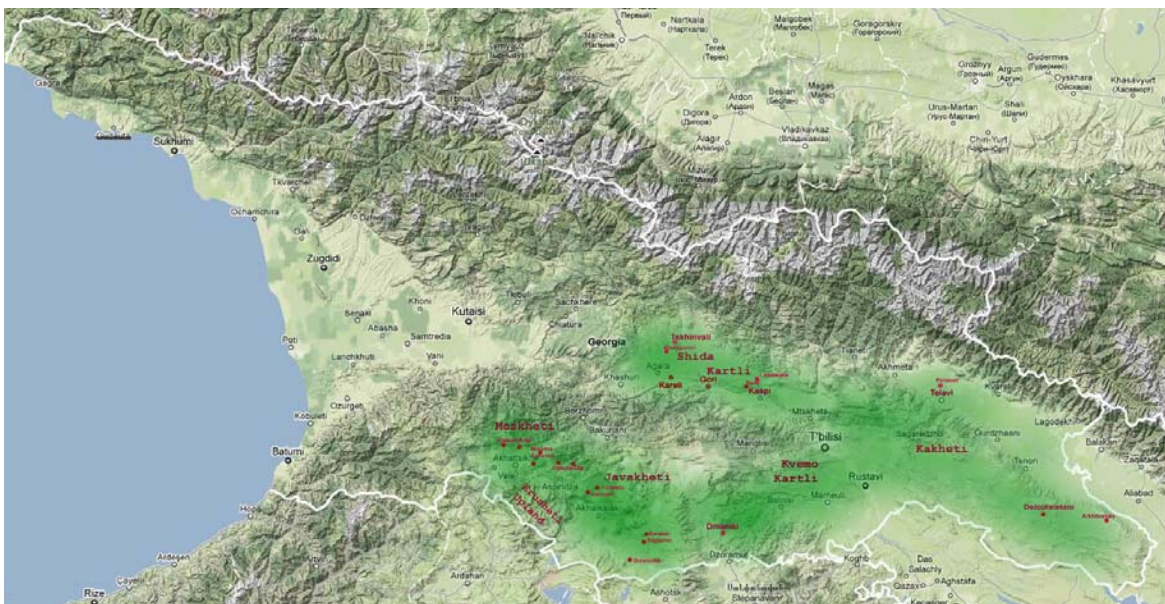
ტულარემიის 2 ანგიო-ბუბონურ შემთხვევა;

- 2007 წლის იანვარში კასპის რაიონში, ს. ზემო რენეში, ადგილი ჰქონდა ტულარემიის აფეთქებას, რომლის დროსაც სეროლოგიურად და კლინიკურად დადასტურდა 22 ოროფარინგეალური და 4 გლანდულარული შემთხვევა (Chitadze N., et al, 2009). სოფლის ცენტრში მდებარე წყაროს სინჯებიდან

მიღებული იყო ტულარემიის ოთხი კულტურა, ხოლო სოფლის წყალსაცავში, რომელიც მოშორებით, მაღლობის თავზე იყო განლაგებული, ნაპოვნი იყო მღრღნელის ლეში (სურ. 9); ამავე წლის გაზაფხულზე ჩატარებული სავლე სამუშაოების შედეგად კასპის რაიონის სოფ. ზემო რენესა და გორის რაიონის სოფ. ნადარბაზევისა და სოფ. ტყვიავის მიმდებარე ტერიტორიებზე მოპოვებული იქსოდური ტკიპებიდან მიღებული იყო ხუთი კულტურა. მას შემდეგ ამ რეგიონიდან ყოველწლიურად ხდება ტულარემიის მიკრობის მიღება.

- 2007 წლის მარტი-მაისი, გორის რაიონი, ს. ხვითი – ადგილი ჰქონდა დაავადების კიდევ ორ შემთხვევას;
- 2007 წლის მარტი, თბილისი – ერთი შემთხვევა, რომელიც სავარაუდოდ ასპინძის რაიონს უკავშირდებოდა;
- 2007 წლის აგვისტო, ქარელის რაიონი – ერთი შემთხვევა;
- 2008 წლის იანვარი, კასპის რაიონი, ს. ლამისყანა – ერთი შემთხვევა.

ტულარემია საქართველოში ძირითადად აღმოსავლეთ ნაწილშია გავრცელებული, სადაც მრავალფეროვანი გეოგრაფიული მახასიათებლების წყალობით, ტულარემიის გადაცემაში მონაწილე მრავალი რეზერვუარი და ვექტორია ჩართული.



სურათი 10. ტულარემიის სავარაუდო გავრცელების ზონა (მწვანე ფერი) საქართველოში

ძუძუმწოვრებს შორის ძირითადი რეზერვუარი / ვექტორი ზღვის დონიდან 800მ-ის ზევით ჩვეულებრივი მემინდვრიაა (*Microtus arvalis*), ხოლო ზღვის დონიდან 800მ-ის ქვემოთ საზოგადოებრივი მემინდვრია (*Microtus socialis*). თუმცა ტულარემიის მიკრობის მრავალფეროვან მასპინძელთან შეგუების უნარის წყალობით ინფექციის გადაცემაში სხვა მღრღნელებიც მონაწილეობენ. ლანდშაფტის თავისებურებებიდან გამომდინარე ეს შეიძლება იყოს წყლის ვირთაგვა (*Arvicola terrestris*), წითელკუდა მექვიშია (*Meriones libicus*), ტყის თაგვი (*Apodemus sylvaticus*), მინდვრის თაგვი (*Apodemus agrarius*) და სახლის თაგვი (*Mus musculus*) (ცხრილი 3).

ექტოპარაზიტებს შორის ამ პათოგენის ვექტორებად ძირითადად იქსოდური (*Dermacentor marginatus*, *Ixodes redicorzevi*, *Ixodes ricinus*) ტკიპები ითვლებიან. მიწის ზედაპირიდან მოპოვებული ზრდასრული ტკიპი საშუალოდ 3 მმ-ის, თუმცა მასპინძელ ცხოველზე მიმაგრების შემდეგ ნაკვები პარაზიტი გაცილებით დიდ ზომებს აღწევს. გამაზისებური ტკიპები (*Gamasidae*) და სხვადასხვა რწყილები, რომელთა ზომები დაახლოებით 1მმ-ია, ბუნებაში ტულარემიის ცირკულაციაში მალალმთიან რეგიონებში ერთვებიან.



სურათი 12. ტულარემიის გადამტანები საქართველოში ექტოპარაზიტები:

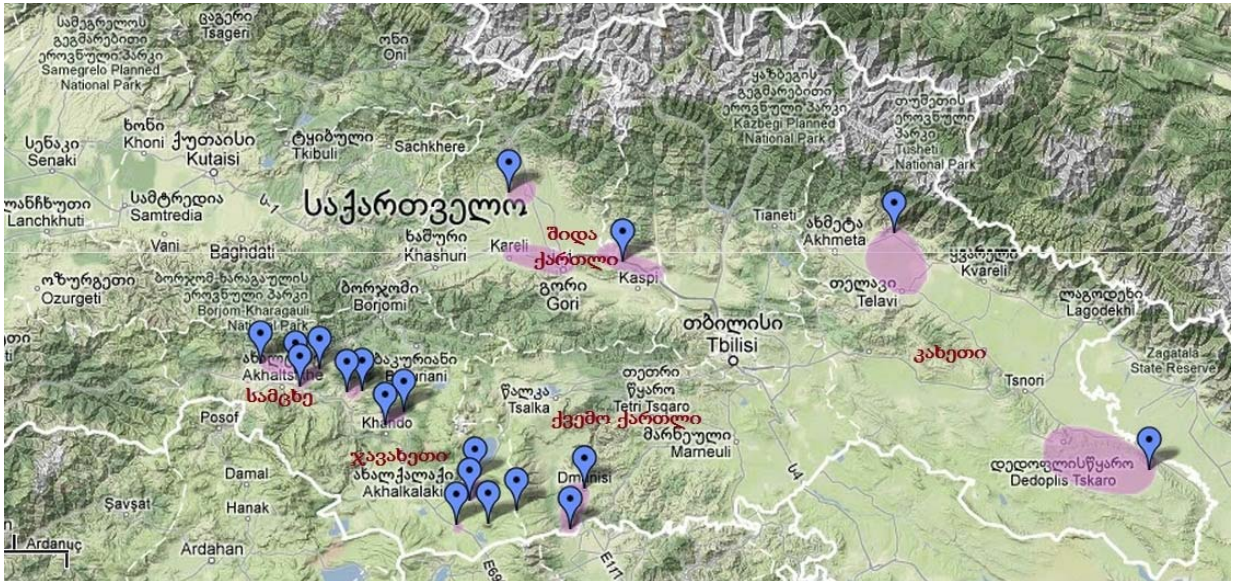
ა,ბ) იქსოდური ტკიპები (*Dermacentor marginatus*); გ,დ) გამაზისებური ტკიპები



სურათი 12. ტულარემიის გადამტანები საქართველოში, მღრღნელები:

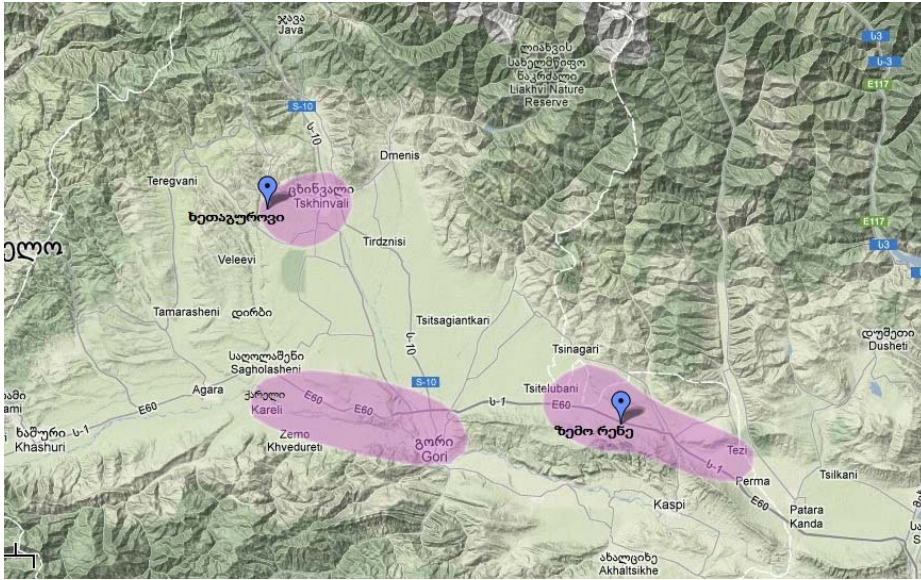
ა) *Microtus arvalis* - ჩვეულებრივი მემინდვრია;

გეოგრაფიული მონაცემების მიხედვით ტულარემიის ორი ძირითადი ბუნებრივი კერა შეიძლება გამოცაკლევდეს – ქართლ-კახეთისა და მესხეთ-ჯავახეთის (სურ. 10, 13).

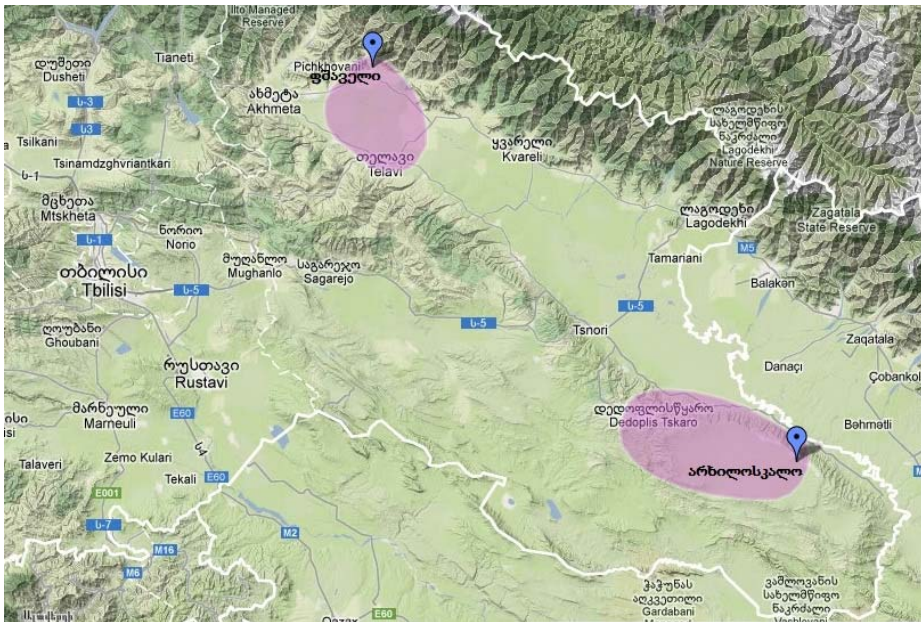


სურათი 13. ტულარემიის აქტიური კერების განაწილება აღმოსავლეთ საქართველოში

ქართლ-კახეთის კერაში შემავალი შიდა ქართლის დაბლობი და ელდარისა და შირაქის ველები კახეთში ერთიან კერად შეიძლება განვიხილოთ, რადგან აქ გავრცელებული გადამტანების საერთო კომპლექსი და მსგავსი გეოგრაფიული არეალია წარმოდგენილი (ცხრილი 3). კერძოდ, შიდა ქართლის დაბლობი ზღვის დონიდან საშუალოდ 600 მ სიმაღლეზეა გაშლილი. იგი ქ. ხაშურის მახლობლად იღებს სათავეს, აღმოსავლეთის მიმართულებით მდინარე მტკვარს მიუყვება და კახეთში ელდარისა და შირაქის ველებს უერთდება. ამ გეოგრაფიულ არეალში გავრცელებულია საზოგადოებრივი მემინდვრია (*Microtus socialis*), რომელიც საქართველოში ზღვის დონიდან 800 მ-ის ქვემოთ ბინადრობს, ტყის თაგვი (*Apodemus sylvaticus*), მინდვრის თაგვი (*Apodemus agrarius*) და სახლის თაგვი (*Mus musculus*), ხოლო კახეთის ველებზე მათ წითელკუდა მექვიშია (*Meriones libycus*) ემატებათ. თუმცა მიჩნეულია, რომ შიდა ქართლის კერაში ტულარემიის გავრცელებაში დომინანტური როლი მაინც იქსოდურ ტკიპებს უკავიათ. გეოგრაფიულად ეს არეალი აზერბაიჯანის ტერიტორიას ერწყმის და შესაბამისად ტულარემიის ერთი დიდი კერის ნაწილს წარმოადგენს.



სურათი 14. ტულარემიის აქტიური კერები შიდა ქართლში



სურათი 15. ტულარემიის აქტიური კერები კახეთში

რეგისტრირებული შემთხვევებისა და აფეთქებების მიხედვით ქართლ-კახეთის კერაში შესაძლებელია გამოვყოთ შემდეგი აქტიური მიკროკერები:

- შიდა ქართლი:
 - კასპის რაიონი, სოფ. ზემო რენეს მიმდებარე ტერიტორია;
 - გორისა და ქარელის რაიონში შემავალი სოფლები;
 - ცხინვალის რაიონის სოფ. ხეთაგუროვი;

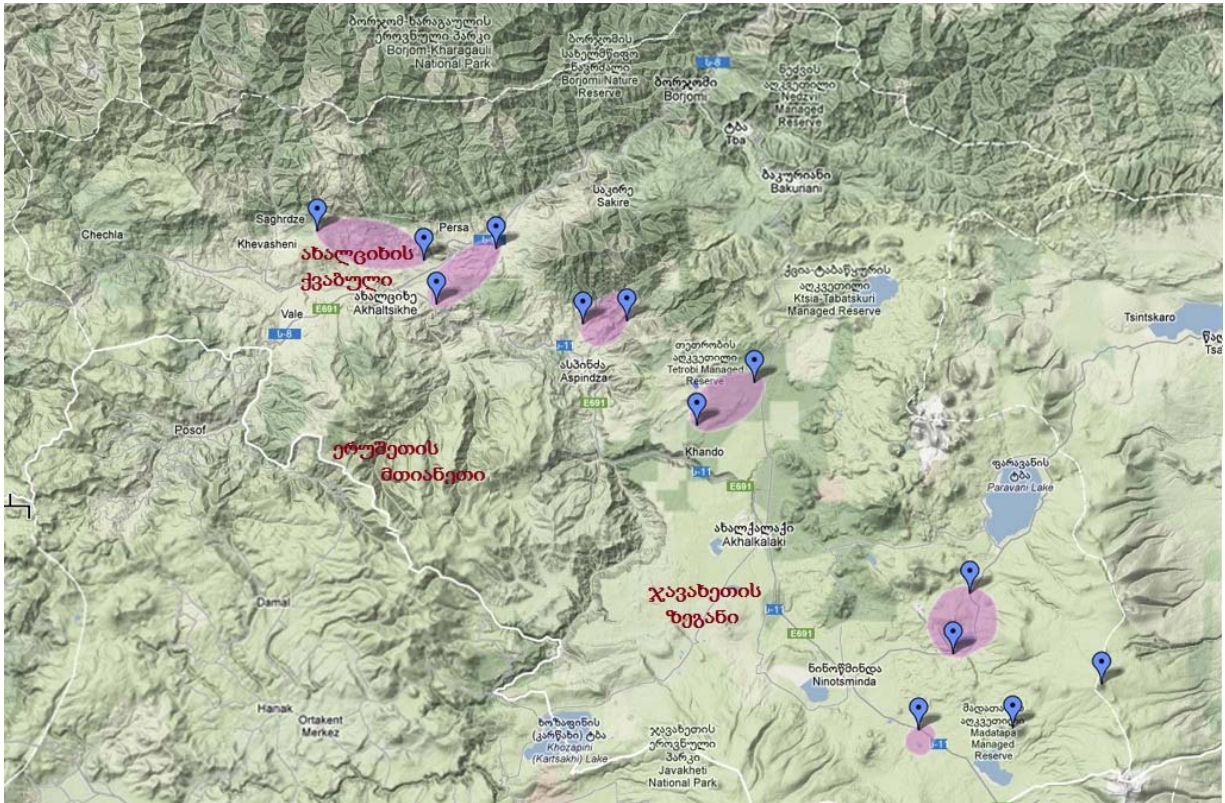
- კახეთში:
 - თელავი - ფშაველი;
 - დედოფლისწყარო - არხილოსკალო;
- ქვემო ქართლი
 - დმანისი - ირგანჩაი



სურათი 16. ტულარემიის აქტიური კერები ქვემო ქართლში

ქვემო ქართლი, ანუ ქ. დმანისის მიმდებარე ტერიტორია ასევე ტულარემიის ქართლის კერას ეკუთვნის, თუმცა გეოგრაფიული თვალსაზრისით ის მკვეთრად განსხვავდება შიდა ქართლისაგან. ეს ტერიტორია თრიალეთის ქედს ეკუთვნის, რომელიც თავის მხრივ მცირე კავკასიონის ქედის ნაწილია. მათათა ეს სისტემა შავი ზღვის სანაპიროებზე იღებს სათავეს, დიდი კავკასიონის ქედის თითქმის პარალელურად მთელ სამხრეთ საქართველოს გადაკვეთს და სომხეთის მაღალმთიანეთში გადადის. სწორედ ამიტომ ამ რეგიონის, როგორც ტულარემიის გავრცელების არეალის, დამოუკიდებლად განხილვა არ არის მიზანშეწონილი და იგი ჯავახეთის ზეგანის კერას უფრო უნდა მივაკუთვნოთ, ვიდრე ქართლის დაბლობს. სიმაღლე აქ ზღვის დონიდან 1000 მ-ზე მეტია და შედეგად აქ გავრცელებული ფლორაც განსხვავდება შიდა ქართლის მობინადრეებისაგან. აქ გავრცელებულია ჩვეულებრივი

მემინდვრია (*Mictorus arvalis*), რომელიც საქართველოში 800 მ ზევით ბინადრობს, წყლის ვირთაგვა (*Arvicola terrestris*) და ტყის თაგვი (*Apodemus sylvaticus*). აქ ისევ დიდი რაოდენობით გვხვდება იქსოდური ტკიპები, თუმცა აქტიურ გადამტანთა სიაში უკვე გამაზისებური ტკიპები და რწყილებიც გვხვდება.



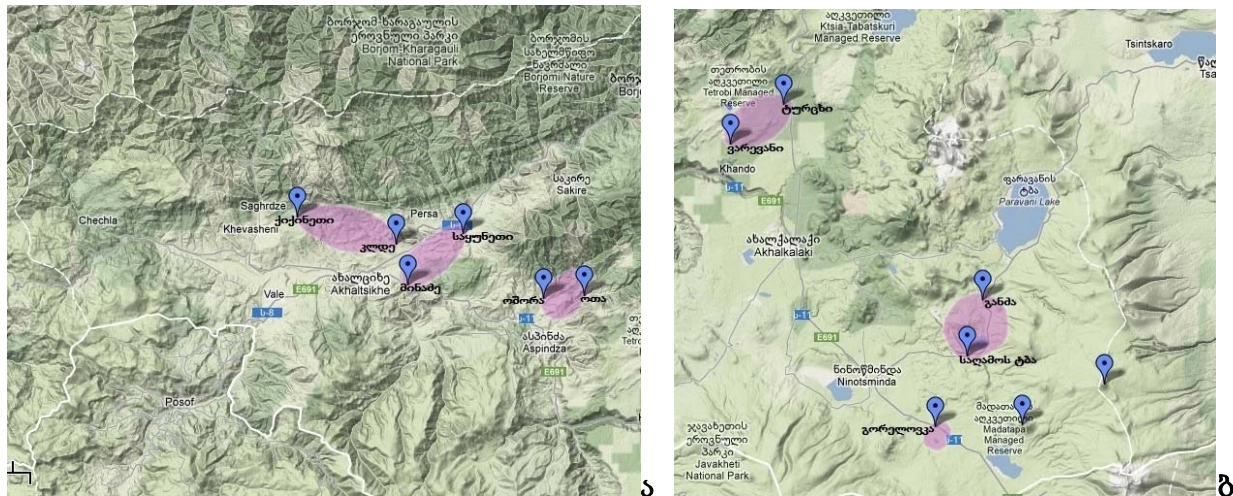
სურათი 17. ტულარემიის აქტიური კერები სამცხე-ჯავახეთში

ორიალეთის ქედი საქართველოს სამხრეთ-დასავლეთის მიმართულებით გრძელდება და ჯავახეთის ზეგანს უერთდება. ეს ტერიტორია ზღვის დონიდან საშუალოდ 2000 მ სიმაღლეზეა, მისი ფლორის წარმომადგენლები, რომლებიც ტულარემიის გადამტანებად არიან მიჩნეულნი ძუძუმწოვრებიდან ჩვეულებრივი მემინდვრია (*Mictorus arvalis*), წყლის ვირთაგვა (*Arvicola terrestris*) და ტყის თაგვი (*Apodemus sylvaticus*), ხოლო ექტოპარაზიტებიდან მხოლოდ მღრღნელების სოროებში მობინადრე გამაზისებური ტკიპები და რწყილებიც გვხვდება.

ჯავახეთის ზეგანს დასავლეთით ერუშეთის ქედი ესაზღვრება, რომლის ნაწილი დღეს თურქეთის ტერიტორიას ეკუთვნის. ამ ადგილებში მოსახლეობა პრაქტიკულად არ გვხვდება, თუმცა ტულარემიის მიკრობი გამოყოფილია მღრღნელებისა და

ექტოპარაზიტების ნიმუშებიდან. ამ ადგილებში გადამტანთა რიცხვს ეკუთვნიან ჩვეულებრივი მემინდვრია (*Mictorus arvalis*), ტყის თაგვი (*Apodemus sylvaticus*), იქსოდური და გამაზისებური ტკიპები და რწყილები.

კიდევ უფრო დასავლეთით, მესხეთში ტულარემიის კერა ახალციხის ქვაბულის ირგვლივ არის განლაგებული. აქ სიმაღლე ზღვის დონიდან საშუალოდ 900-1000 მ-ია. ტულარემიის გადამტანებიდან ისევ ჩვეულებრივი მემინდვრია (*Mictorus arvalis*), ტყის თაგვი (*Apodemus sylvaticus*), იქსოდური და გამაზისებური ტკიპები და რწყილებია.



სურათი 18. ტულარემიის აქტიური კერები სამცხეში (ა) და ჯავახეთში (ბ)

მესხეთ-ჯავახეთის კერაში მიკროკერების სახით შესაძლებელია გამოცალკევდეს:

- მესხეთი (ახალციხის ქვაბული)
 - მინამდე-საყუნეთი;
 - ომორა-ოთა;
 - კლდე-ქიქინეთი
- ჯავახეთის ზეგანი
 - ტურცხი-ვარევანი;
 - სალამო-განმა;
 - გორელოვკა
- ერუშეთის მთიანეთი (Velijanashvili I, 1992).

ცხრილი - 3 . ტულარემიის კერები და გადამტანები საქართველოში

კერები / მიკროკერები	სიმაღლე ზღვის დონიდან (მ)	ძირითადი მღრღნელი რეზერვუარი	ძირითადი ექტოპარაზიტი რეზერვუარი / ვექტორი
მესხეთ-ჯავახეთის ბუნებრივი კერა:			
მესხეთი - ახალციხის ქვაბული			
მინაძე-საყუნეთი	940	<i>Mictorus arvalis;</i> <i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Ixodes sp., Haemaphysalis sp.,</i> <i>Gamazidae, რწყილები</i>
ოშორა-ოთა	1100-1300	<i>Mictorus arvalis;</i> <i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Ixodes sp., Haemaphysalis sp.,</i> <i>Gamazidae, რწყილები</i>
კლდე-ქიქინეთი	1000-1400	<i>Mictorus arvalis;</i> <i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Ixodes sp., Haemaphysalis sp.,</i> <i>Gamazidae, რწყილები</i>
ჯავახეთი - ჯავახეთის ზეგანი, ალპური პლატო (ახალქალაქი, ნინოწმინდა)			
ტურცხი-ვარევანი	1700	<i>Mictorus arvalis;</i> <i>Arvicola terrestris;</i> <i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Gamazidae,</i> <i>რწყილები</i>
სალამო-განძა	2000	<i>Mictorus arvalis;</i> <i>Arvicola terrestris;</i> <i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Gamazidae,</i> <i>რწყილები</i>
გორელოვკა	2000	<i>Mictorus arvalis;</i> <i>Arvicola terrestris;</i> <i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Gamazidae,</i> <i>რწყილები</i>
ერუშეთის მალლობი	1800-2800	<i>Mictorus arvalis; Apodemus sylvaticus</i>	<i>Ixodes sp.,</i> <i>Gamazidae, რწყილები</i>
ქართლ-კახეთის ბუნებრივი კერა			
შიდა ქართლი - დაბლობი და ველები			
კასპი - ზემო რენე	760	<i>Microtus socialis;</i> <i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Ixodes sp., Haemaphysalis sp.</i> <i>Gamazidae, რწყილები</i>
გორი - ქარელი	600	<i>Microtus socialis;</i> <i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Ixodes sp., Haemaphysalis sp.</i> <i>Gamazidae, რწყილები</i>
ცხინვალი - ხეთაგუროვი	920	<i>Microtus socialis;</i> <i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Ixodes sp., Haemaphysalis sp.</i> <i>Gamazidae, რწყილები</i>
კახეთი - დაბლობი და ველები			
თელავი - ფშაველი	740	<i>Microtus socialis;</i> <i>Apodemus sylvaticus;</i> <i>Apodemus agrarius</i>	<i>Ixodes sp., Haemaphysalis sp.</i>
დედოფლისწყარო - არხილოსკარო	660	<i>Microtus socialis;</i> <i>Apodemus sylvaticus;</i> <i>Apodemus agrarius</i>	<i>Ixodes sp., Haemaphysalis sp.</i>
ქვემო ქართლი - მალლობი (ერწყმის ჯავახეთის პლატოს)			
დმანისი, ირგანჯი	1220-1680	<i>Mictorus arvalis;</i> <i>Arvicola terrestris;</i> <i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Ixodes sp.,</i> <i>Gamazidae, რწყილები</i>

როგორც ერთხელ უკვე ვახსენეთ, ტულარემიის საფრთხე საქართველოში ძირითადად ქვეყნის აღმოსავლეთ ნაწილზე ვრცელდება. ამ რეგიონებში ყოველწლიურად ხდება ახალი შტამის იზოლირება.

შემჩნეულია საქართველოში ტულარემიით ინფიცირების სეზონური თავისებურებანი. ასე მაგალითად, ტკიპების აქტიური ცხოველმოქმედება იწყება ადრე გაზაფხულიდან გვიან შემოდგომამდე. შესაბამისად, ეპიზოოტიებსაც ამავე პერიოდში აქვთ ადგილი. სამაგიეროდ, ადამიანებში ტულარემიის შემთხვევები ძირითადად რეგისტრირდება გვიანი შემოდგომიდან ადრე გაზაფხულამდე, რადგან ამ პერიოდში იწყება საშემოდგომო სამუშაოები და ნადირობის სეზონი. ამასთან, საკვების მოძიების მიზნით მღრღნელები მასიურად იწყებენ გადანაცვლებას დასახლებული პუნქტებისაკენ.

მიუხედავად ტულარემიით ინფიცირების საკმარისად ხშირი შემთხვევებისა, დიდი ხანია, რაც არ ჩატარებულა ამ პათოგენზე ორიენტირებული, სპეციალური საველე



სურათი 19. ა) ტკიპების მოპოვება მიწის ზედაპირიდან; ბ) იქსოდური ტკიპა სინჯარაში

სამუშაოები, არ მომხდარა მოსახლეობაში ინფექციის გავრცელების ხარისხის დადგენა. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ დღემდე საველე სამუშაოები ძირითადად შავი ჭირის ბუნებრივ კერებში, ან ტულარემიის აფეთქებებისა და სპორადული შემთხვევების ადგილებში ტარდებოდა.

მოყოლებული 1956 წლიდან დღემდე საველე სამუშაოების დროს გარემოდან იზოლირებული და ინსტიტუტის კოლექციაში შენახული იყო *F. tularensis* 465 შტამი, რომელთა უმეტესობა სამცხე-ჯავახეთის რეგიონში 1970-2000 წლებში იყო იზოლირებული (ცხრილი 6.). ამასთან, ჩატარებული ბიოქიმიური კვლევების მიხედვით

დადგინდა, რომ საქართველოში, ისევე როგორც ევრაზიის კონტინენტის უმეტეს ნაწილში, გავრცელებულია *F. tularensis* ტიპი B – *holarctica* (Velijanashvili I, 1992).

ცხრილი - 4. ორ კერაში იზოლირებული *F. tularensis* შტამების გადანაწილება დეკადების მიხედვით

რეგიონი / დეკადა	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2010	სულ:
	-59	-69	-79	-89	-99	-09	-12	
ქართლ-კახეთი	8	10	5	64	14	29	13	143
სამცხე-ჯავახეთი	1	21	109	72	101	14	0	318
სულ:	12	32	114	136	115	43	13	465

თუმცა ამ შტამების უმეტესი ნაწილის შენარჩუნება ვერ მოხერხდა, მათი ეპიდემიოლოგიური მონაცემების ანალიზით ნათლად დასტურდება ზემოთ აღწერილი დებულებები სხვადასხვა კერებში განსხვავებული ვექტორებისა და რეზერვუარების არსებობის შესახებ (ცხრილი 5). მაგალითად აშკარაა, რომ ქართლის დაბლობზე შტამების უმრავლესობა იქსოდური ტკიპებიდანაა გამოყოფილი; მესხეთსა და ჯავახეთის ნაწილში, ზღვის დონიდან შედარებით დაბალ სიმაღლეზე წამყვანი როლი იქსოდურ ტკიპებს და მღრღნელებს ეკუთვნით; ხოლო ჯავახეთის მაღალმთიან ზეგანზე შტამები ძირითადად მღრღნელებიდანაა მიღებული.

ცხრილი - 5. იზოლირებული *F. tularensis* შტამების გადანაწილება რეგიონებისა და წყაროს მიხედვით

შტამის გამოყოფის რეგიონი / წყარო	კახეთი - დედოფლისწყარო	ქვემო ქართლი - დმანისი	შიდა ქართლი - ხაშური, ქარელი, თბილისი	შიდა ქართლი - ცხინვალი	შიდა ქართლი - კასპი	შიდა ქართლი - გორი	სამცხე - ადიგენი	სამცხე - ახალციხე	ჯავახეთი - ასპინძა	ჯავახეთი - ახალქალაქი	ჯავახეთი - ნინოწმინდა	სულ:
რწყილი	5	0	2	0	0	5	7	29	7	0	2	57
გამაზისებური ტკიპი	1	1	0	0	0	0	6	2	6	2	2	20
ტკიპი	1	0	5	3	24	64	6	63	22	3	1	192
მღრღნელი	6	7	3	0	0	11	24	66	26	9	26	178
წყალი/თივა	0	0	2	0	4	1	0	1	0	0	0	8
კატა	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ბიგა	0	0	0	1	0	2	0	2	2	0	0	7
უცნობი	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
სხვა	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
სულ	13	8	13	4	28	84	44	163	63	14	31	465

საინტერესოა, რომ დღემდე დასავლეთ საქართველოში ტულარემიით ინფიცირების არცერთი შემთხვევა რეგისტრირებული არ ყოფილა. შესაბამისად, ამ რეგიონში არასოდეს ჩატარებულა საველე სამუშაოები და არ არის დადგენილი ვექტორებისა და რეზერვუარების შესაძლო რგოლები. არსებული მოსაზრების მიხედვით ეს რეგიონი ტულარემიისაგან თავისუფალ ტერიტორიად ითვლება, თუმცა საკმარისი მტკიცებულებების გარეშე ამის დანამდვილებით თქმა არ შეიძლება.

ყოველივე ზემოთქმული აძლიერებს ინტერესს ამ განსაკუთრებით საშიში ინფექციის მიმართ და მისი დიაგნოსტიკისა, მოლეკულური ტიპირების გაუმჯობესების და მისი გავრცელების უფრო დეტალური კვლევის გაგრძელების აუცილებლობაზე მიგვითითებს.

კვლევის მიზანი

საქართველოს დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის (დკსჯეც) კოლექციაში არსებული *F. tularensis* 103 შტამის (ცხრილი-3) მოლეკულური ტიპირება, პასპორტიზაცია, მათი ეპიდემიოლოგიური დაჯგუფება, გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხეზე განთავსება, ასევე საქართველოში გავრცელებული შტამების საერთო მონაცემთა ბაზის შექმნა მოცემული სამუშაოს უმთავრეს ამოცანას წარმოადგენდა;

ამას გარდა, საჭირო იყო სწრაფი გენოტიპირების მეთოდის შემუშავება, რომელიც შესაძლებელს გახდიდა ახლად იზოლირებული *F. tularensis* შტამების, კლინიკური და გარემო ნიმუშების წარმომავლობისა და გენეტიკური კავშირების დადგენას და ამასთან ინფექციის გავრცელების გზის მიდევნების საშუალებას მოგვცემდა.

ცხრილი - 6. დვსჯეც ცოცხალ კულტურათა მუზეუმში არსებული *F. tularensis* შტამების ზოგადი მონაცემები, 2012 წ.

დნმ #	შტამის #	იზოლაციის წელი	შტამის იზოლაციის წყარო	შტამის იზოლაციის რაიონი	შტამის იზოლაციის ადგილი	კერა
1	4941/56-G	1956	მქვიშია, <i>Meriones eritrourus (lybicus)</i>	დედოფლისწყარო	სამუხის სტეპი, ფერმა	კახეთი
2	4947/56-G	1956	იქსოდური ტკიპა, <i>Ixodae, Hyalomma plumbeum</i>	დედოფლისწყარო	მთა ნაზარლები	კახეთი
3	4944/74-G	1974	ბიგა, <i>Sorex</i>	ცხინვალი	სოფ. ხეთაგუროვი	შიდა ქართლი
4	0867/77-G	1977	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ადიგენი	სოფ. ქიქინეთი	სამცხე-ჯავახეთი
5	0932/77-G	1977	ფრინველების ამონანთხევი	ადიგენი	სოფ. უდეს საძოვარი	სამცხე-ჯავახეთი
6	1263/78-G	1978	ტყის თაგვი, <i>Apodemus silvaticus</i>	ახალციხე	მთა ციპორა	სამცხე-ჯავახეთი
7	1803/80-G	1980	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. სვენეთი	შიდა ქართლი
8	1935/80-G	1980	წყაროს წყალი	ახალციხე	ბენზინ-გასამართი სადგური	სამცხე-ჯავახეთი
9	1940/80-G	1980	სახლის თაგვი, <i>Mus musculus</i>	ასპინძა	სოფ. ხერთვისი	სამცხე-ჯავახეთი
10	1996/80-G	1980	საზოგადოებრივი მემინდვრია, <i>Microtus socialis</i>	ხაშური	სოფ. აგარები	შიდა ქართლი
11	1998/80-G	1980	რწყილი, <i>Rh. uranica</i>	გორი	სოფ. ხიდისთავი	შიდა ქართლი
12	2068/81-G	1981	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ახალშენი	შიდა ქართლი
13	2683/82-G	1982	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ტინისხიდი	შიდა ქართლი
14	2799/82-G	1982	წყლის ვირთაგვა, <i>Arvicola terrestris</i>	გორი	სოფ. ბერბუკი	შიდა ქართლი
15	2800/82-G	1982	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. შავშვები	შიდა ქართლი
16	2816/82-G	1982	წყლის ვირთაგვა, <i>Arvicola terrestris</i>	გორი	სოფ. რეხი	შიდა ქართლი
17	2827/82-G	1982	წყალი	გორი	სოფ. ბერბუკი	შიდა ქართლი
18	2828/82-G	1982	საზოგადოებრივი მემინდვრია, <i>Microtus socialis</i>	გორი	სოფ. ატენი	შიდა ქართლი
19	6141/86-G	1986	ჩვეულეზრივი მემინდვრია, <i>Microtus arvalis</i>	ახალციხე	სოფ. მინამე	სამცხე-ჯავახეთი
20	6176/86-G	1986	ჩვეულეზრივი მემინდვრია, <i>Microtus arvalis</i>	ასპინძა	სოფ. ინდუსა	სამცხე-ჯავახეთი
21	7149/87-G	1987	გამაზისებური ტკიპა, <i>Gamasidae</i>	ახალციხე	სოფ. მინამე	სამცხე-ჯავახეთი
22	8120/90-G	1990	ჩვეულეზრივი მემინდვრია, <i>Microtus arvalis</i>	დმანისი	სოფ. ირგანჩაი	ქვემო ქართლი
23	8121/90-G	1990	ჩვეულეზრივი მემინდვრია ლეში, <i>Microtus arvalis</i>	დმანისი	სოფ. ირგანჩაი	ქვემო ქართლი
24	8124/90-G	1990	იქსოდური ტკიპის ნიმუშა, <i>Ixodes</i>	ახალქალაქი	სოფ. ორჯა	სამცხე-ჯავახეთი
25	8152/90-G	1990	ჩვეულეზრივი მემინდვრია, <i>Microtus arvalis</i>	დმანისი	სოფ. ირგანჩაი	ქვემო ქართლი
26	8153/90-G	1990	ჩვეულეზრივი მემინდვრია ლეში, <i>Microtus arvalis</i>	დმანისი	სოფ. ირგანჩაი	ქვემო ქართლი
27	8226/90-G	1990	იქსოდური ტკიპა, <i>Ixodes redicorsevi</i>	ახალციხე	სოფ. კლდე	სამცხე-ჯავახეთი
28	8474/91-G	1991	გამაზისებური ტკიპა, <i>Gamasidae</i>	დმანისი	სოფ. ირგანჩაი	ქვემო ქართლი
29	8515/91-G	1991	წყლის ვირთაგვა, <i>Arvicola terrestris</i>	დმანისი	სოფ. ირგანჩაი	ქვემო ქართლი
30	8524/91-G	1991	ჩვეულეზრივი მემინდვრია ლეში, <i>Microtus arvalis</i>	ახალციხე	სოფ. კლდე	სამცხე-ჯავახეთი
31	8531/91-G	1991	იქსოდური ტკიპა, <i>Ixodes redicorsevi</i>	ახალციხე	სოფ. კლდე	სამცხე-ჯავახეთი
32	8740/92-G	1992	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ადიგენი	სოფ. ქიქინეთი	სამცხე-ჯავახეთი

33	879/92-G	1992	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ახალციხე	სოფ. მინაძე	სამცხე-ჯავახეთი
34	8798/92-G	1992	ჩვეულეზრივი მემინდვრია, <i>Microtus arvalis</i>	ახალციხე	სოფ. კლდე	სამცხე-ჯავახეთი
35	8909/97-G	1997	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ახალქალაქი	სოფ. ტურცხი	სამცხე-ჯავახეთი
36	8910/97-G	1997	ჩვეულეზრივი მემინდვრია ლეში, <i>Microtus arvalis</i>	ახალქალაქი	სოფ. ტურცხი	სამცხე-ჯავახეთი
37	8911/97-G	1997	ჩვეულეზრივი მემინდვრია, <i>Microtus arvalis</i>	ახალქალაქი	სოფ. ტურცხი	სამცხე-ჯავახეთი
38	8912/97-G	1997	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ახალქალაქი	სოფ. ტურცხი	სამცხე-ჯავახეთი
39	8913/97-G	1997	რწყილეზი (სახეობა დადგენილი არაა)	ახალციხე	სოფ. მინაძე	სამცხე-ჯავახეთი
40	8916/97-G	1997	ჩვეულეზრივი მემინდვრია, <i>Microtus arvalis</i>	ასპინძა	სოფ. ხერთვისი	სამცხე-ჯავახეთი
41	8917/97-G	1997	ტყის თაგვი, <i>Apodemus silvaticus</i>	ასპინძა	სოფ. ოშორა	სამცხე-ჯავახეთი
42	8975/97-G	1997	ხორბალი	ქარელი	სოფ. რუისი	შიდა ქართლი
43	8976/97-G	1997	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis punctata</i>	ქარელი	სოფ. რუისი	შიდა ქართლი
44	8977/97-G	1997	ხორბალი	ქარელი	სოფ. რუისი	შიდა ქართლი
45	8978/97-G	1997	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ქარელი	სოფ. რუისი	შიდა ქართლი
46	8979/97-G	1997	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis punctata</i>	ქარელი	სოფ. რუისი	შიდა ქართლი
47	8980/97-G	1997	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis punctata</i>	ქარელი	სოფ. რუისი	შიდა ქართლი
48	1469/02-G	2002	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ასპინძა	ასპინძა	სამცხე-ჯავახეთი
49	1470/02-G	2002	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ასპინძა	ასპინძა	სამცხე-ჯავახეთი
50	2024/02-G	2002	ჩვეულეზრივი მემინდვრია ლეში, <i>Microtus arvalis</i>	ნინოწმინდა	ნინოწმინდა	სამცხე-ჯავახეთი
51	2025/02-G	2002	ჩვეულეზრივი მემინდვრია ლეში, <i>Microtus arvalis</i>	ნინოწმინდა	ნინოწმინდა	სამცხე-ჯავახეთი
52	2026/02-G	2002	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ნინოწმინდა	ნინოწმინდა	სამცხე-ჯავახეთი
53	2027/02-G	2002	ჩვეულეზრივი მემინდვრია, <i>Microtus arvalis</i>	ნინოწმინდა	ნინოწმინდა	სამცხე-ჯავახეთი
54	4754/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ასპინძა	სოფ. ინდუსა	სამცხე-ჯავახეთი
55	4755/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ასპინძა	სოფ. ინდუსა	სამცხე-ჯავახეთი
56	4777/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი
57	4778/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი
58	4779/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი
59	4780/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი
60	4781/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი
61	4787/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი
62	4788/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი
63	4790/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ასპინძა	ასპინძა	სამცხე-ჯავახეთი
64	4791/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis otophila</i>	ასპინძა	ასპინძა	სამცხე-ჯავახეთი
65	4792/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ასპინძა	ასპინძა	სამცხე-ჯავახეთი
66	4803/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ნაწრეტი	შიდა ქართლი
67	4804/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ორქოსანი	შიდა ქართლი
68	4807/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis otophila</i>	გორი	სოფ. ნაწრეტი	შიდა ქართლი

69	4808/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ტყვიავი	შიდა ქართლი
70	4809/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ხურვალეთი	შიდა ქართლი
71	4810/04-G	2004	გამაზისებური ტკიპა, <i>Gamasidae</i>	ასპინძა	სოფ. ოთა	სამცხე-ჯავახეთი
72	4811/04-G	2004	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	ასპინძა	ასპინძა	სამცხე-ჯავახეთი
73	4812/04-G	2004	გამაზისებური ტკიპა, <i>Gamasidae</i>	ასპინძა	ასპინძა	სამცხე-ჯავახეთი
74	6955/07-G	2007	სასმელი წყალი	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
75	6956/07-G	2007	სასმელი წყალი	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
76	6957/07-G	2007	სასმელი წყალი	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
77	6958/07-G	2007	სასმელი წყალი	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
78	7435/07-G	2007	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
79	7436/07-G	2007	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი
80	7437/07-G	2007	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis otophila</i>	გორი	სოფ. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი
81	7573/07-G	2007	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი
82	7574/07-G	2007	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ტყვიავი	შიდა ქართლი
83	8896/08-G	2008	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis otophila</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
84	8897/08-G	2008	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis otophila</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
85	8898/08-G	2008	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis otophila</i>	გორი	სოფ. ლამისყანა	შიდა ქართლი
86	8932/08-G	2008	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
87	8933/08-G	2008	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis sulcata</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
88	10351/09-G	2009	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
89	10352/09-G	2009	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
90	10353/09-G	2009	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
91	0967/10-G	2010	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
92	0968/10-G	2010	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
93	0969/10-G	2010	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
94	1296/11-G	2011	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis otophila</i>	გორი	სოფ. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი
95	1297/11-G	2011	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ნიქოზა	შიდა ქართლი
96	1298/11-G	2011	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	კასპი	სოფ. იგეთი	შიდა ქართლი
97	1300/11-G	2011	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ფლავი	შიდა ქართლი
98	1309/11-G	2011	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ქიწნისი	შიდა ქართლი
99	1688/12-G	2012	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	კასპი	სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი
100	1689/12-G	2012	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	კასპი	სოფ. ქვემო ჭალა	შიდა ქართლი
101	1690/12-G	2012	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis sulcata</i>	კასპი	სოფ. ქვემო ჭალა	შიდა ქართლი
102	1691/12-G	2012	იქსოდური ტკიპა, <i>Haemaphysalis punctata</i>	კასპი	სოფ. ოკამი	შიდა ქართლი
103	1720/12-G	2012	იქსოდური ტკიპა, <i>Dermacentor marginatus</i>	გორი	სოფ. ტყვიავი	შიდა ქართლი

კვლევის მეთოდები

შემოსული ნიმუშების პირველადი დამუშავება

კვლევის ყველა ეტაპი ტარდებოდა თანამედროვე მეთოდების გამოყენებით და ბიოუსაფრთხოების სტანდარტების დაცვით. *F. tularensis* განსაკუთრებით საშიში პათოგენების ჯგუფშია გაერთიანებული და ამის გამო პროცედურები ინფექციურ მასალასთან მიმდინარეობდა ბიოუსაფრთხოების მეორე დონის (BSL-2+) კაბინეტში, პირადი დაცვის აღჭურვილობის (PPE) თანხლებით. სამუშაოები წარმოებდა ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის (WHO) და აშშ საფრთხის შემცირების სააგენტოს (DTRA) რეკომენდაციების საფუძველზე შემუშავებული ალგორითმის მიხედვით. ლაბორატორიული დიაგნოსტიკის შედეგების შეტანა ხდებოდა ელექტრონულ ინტეგრირებულ დაავადებათა ზედამხედველობის სისტემაში (EIDSS).

შემოსული კლინიკური და გარემო ნიმუშების ანალიზი იწყებოდა გრამის წესით შეღებვით. პარალელურად ხდებოდა მასალის სხვადასხვა გამდიდრებულ ნიაგადზე გაზრდა (შოკოლადისებური, ტაიერ-მარტინისა და ცისტეინის შემცველი სისხლიანი (CHAB) არეები). პაციენტის შრავტი მოწმდებოდა *F. tularensis* საწინააღმდეგო ანტისხეულების არსებობაზე. გარდა ამისა, ხდებოდა კლინიკური და გარემო მასალის, ისევე როგორც მიღებული იზოლატის, ლაბორატორიულ თაგვებში ინოკულაცია – ბიოცდა. ცხოველზე დაკვირვება მიმდინარეობდა 10 დღის განმავლობაში და მისი დაცემის შემთხვევაში ხდებოდა შინაგანი ორგანოების, კერძოდ, ელენთისა და ღვიძლის, სელექტიურ ნიადაგებზე გათესვა. იზოლატის მიღების შემთხვევაში იდგმებოდა ბიოქიმიური ტესტები: ოქსიდაზას, ურეაზას, კატალაზასა და ბეტა-ლაქტამაზას აქტივობის განსაზღვრა.

მიღებული შტამის დამადასტურებელი დიაგნოსტიკისათვის გამოიყენებოდა სეროლოგიური (აგლუტინაცია სასაგნე მინაზე) და მოლეკულურ ბიოლოგიური (პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (PCR)) მეთოდები.

ბოლო ეტაპზე ხდებოდა უკვე დადასტურებული *F. tularensis* შტამების მოლეკულური გენოტიპირება რამოდენიმე განსხვავებული მეთოდის, კერძოდ კი PFGE, MLVA და SNP ანალიზის გამოყენებით.

სეროლოგიური დიაგნოსტიკა

აგლუტინაცია სინჯარაში

სეროლოგიური დიაგნოსტიკისათვის ანტიგენის სახით გამოიყენებოდა *F. tularensis* ადგილობრივი შტამების თერმულად ინაქტივირებული უჯრედები.

პაციენტისაგან აღებული სისხლის შრატის იტიტრებოდა 5 სინჯარაში: 500 მკლ შრატს ემატებოდა 2 მლ ფიზიოლოგიური ხსნარი, ერეოდა პიპეტირებით, 500 მკლ ოდენობით გადადიოდა ახალ სინჯარაში მოთავსებულ 2 მლ ფიზიოლოგიურ ხსნარში, და ა.შ.. შემდეგ ყველა განზავებას ემატებოდა 2 მლ ანტიგენი და იდგმებოდა ოთახის ტემპერატურაზე 24 საათით. შრატში *F. tularensis* საწინააღმდეგო ატისხეულების არსებობის შემთხვევაში სინჯარაში ჩნდებოდა ქოლგისებური ნალექი.

აგლუტინაცია სასაგნე მინაზე

სასაგნე მინაზე აგლუტინაცია *F. tularensis* შტამების დამადასტურებელ ტესტს განეკუთვნებოდა. საკვლევი უჯრედების სუსპენზიას ემატებოდა *F. tularensis* საწინააღმდეგო ატისხეულების შრატი. დადებითი პასუხის შემთხვევაში ხდებოდა სუსპენზიის გამოლექვა. დადებით კონტროლად გამოიყენებოდა ადგილობრივი შტამების თერმული ინაქტივაციის შედეგად მიღებული ანტიგენი.

მოლეკულური დიაგნოსტიკა

დნმ-ის ექსტრაქცია

F. tularensis დნმ-ის ექსტრაქცია ხდებოდა როგორც კლინიკური და გარემო ნიმუშიდან, ასევე მიღებული იზოლატებიდან. ამ მიზნით გამოიყენებოდა დნმ-ის

გამომყოფი ნაკრები –DNA Mini Kit, Qiagen. პროცედურა ტარდებოდა ნაკრების მწარმოებლის ინსტრუქციის შესაბამისად:

1. 200 მკლ ნიმუშს (ტკიპებისა და სხვა ექტოპარაზიტების ემულსია, მღრღნელების ორგანოების ჰომოგენატი, პაციენტის ბუბონის შიგთავსი, 200 მკლ ბუფერში სუსპენდირებული იზოლატი) ემატებოდა 20 მკლ პროტეინაზა-K და 200 მკლ ლიზისის ბუფერი (AL); ნარევის შენჯღრევის შემდეგ ხდებოდა მისი ინკუბაცია 56°C-ზე 10წთ-ის განმავლობაში.
2. ინკუბაციის შემდეგ ნარევს ემატებოდა 200 მკლ ეთილის სპირტი, ხდებოდა მისი გადატანა მემბრანაიან სვეტზე და ცენტრიფუგირება 8000 ბრ/წთ, 1 წთ. ამის შედეგად საკვლევი ნიმუშის დნმ რჩებოდა დაკავშირებული სვეტის მემბრანასთან;
3. ლიზატის მინარევების მოშორების მიზნით სვეტს ემატებოდა 500 მკლ პირველი გამრეცხი ბუფერი (AW1) და ხდებოდა ცენტრიფუგირება 8000 ბრ/წთ, 1 წთ;
4. შემდეგ ეტაპზე სვეტს ემატებოდა 500 მკლ მეორე გამრეცხი ბუფერი (AW2) და ცენტრიფუგირდებოდა მაქსიმალურ სიჩქარეზე 14000 ბრ/წთ, 3 წთ;
5. სუფთა სინჯარში გადატანის შემდეგ სვეტს ემატებოდა 200 მკლ ელუციის (გამხსნელი) ბუფერი (AE), ინკუბირდებოდა ოთახის ტემპერატურაზე 1 წთ და ცენტრიფუგირდებოდა 8000 ბრ/წთ, 1 წთ; მიღებული ექსტრაქტი შეიცავდა სუფთა დნმ-ს, რომელიც ხანგრძლივად ინახებოდა -20°C-ზე.
6. დნმ-ს უტარდებოდა სტერილობის ტესტი: ხსნარის 5% ეწვეთებოდა შოკოლადისებურ აგარზე და ინკუბირდებოდა 37°C 72 სთ-ის განმავლობაში. მიკრობული კოლონიების წარმოქმნის შემთხვევაში დნმ იფილტრებოდა 0.22 მკმ ფილტრში ან ინაქტივირდებოდა 95°C-ზე გაცხელებით 15-20 წთ-ის განმავლობაში, რის შემდეგაც განმეორებით მოწმდებოდა სტერილობაზე.

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში - real-time PCR

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციისათვის რეალურ დროში (real-time PCR) გამოიყენებოდა *F. tularensis* სადიაგნოსტიკო ნაკრები (*F. tularensis* Detection Kit, Idaho Technology, Target1, Target2), რომელიც ემყარება TaqMan-ის ფლუორესცენტული

ზონდების პრინციპს. რეაქცია მიმდინარეობდა კაპილარულ თერმოციკლერში ექვსი ფლორესცენტული ოპტიკური არხით – Light Cycler 2.0, Roche. 40 მკლ დნმ ემატებოდა მშრალ სარეაქციო არეს, რომელიც შეიცავდა ამპლიფიკაციისათვის აუცილებელ Mg²⁺-ის იონებს, Taq-პოლიმერაზას, სპეციფიკური უბნის პრაიმერებსა და ფლორესცენტული საღებავით მონიშნულ ზონდს. ნარევი თანაბრად ნაწილდებოდა ორ კაპილარში და იდგმებოდა ამპლიფიკატორში შემდეგი სარეაქციო პირობებით:

საწყისი დენატურაცია	95°C	2 წმ	45 ციკლი
დენატურაცია	95°C	1 წმ	
ამპლიფიკაცია	60°C	20 წმ	

შედეგების ვიზუალიზაცია რეაქციის მიმდინარეობის პარალელურად ხდებოდა, ხოლო მათი საბოლოო შეფასება კომპიუტერული პროგრამის მეშვეობით რეაქციის დასრულებისთანავე იყო შესაძლებელი. რეაქციის სრული დრო საშუალოდ 25-30 წუთს მოიცავდა.



სურათი 20. *F. tularensis* real-time PCR ცდის ნიმუში

მოლეკულური ტიპირება

გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში – Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

PFGE ბაქტერიული შტამების მოლეკულური დიფერენცირების ერთ-ერთ ყველაზე გავრცელებულ მეთოდს წარმოადგენს. PFGE მოლეკულური ტიპირების მეთოდების “ოქროს სტანდარტად” არის მიჩნეული, ხასიათდება მაღალი გარჩევადობის უნარით და გამოიყენება მრავალი პათოგენის გენოტიპირებისათვის. მეთოდი დაფუძნებულია

კულტურიდან ნატიური გენომური დნმ-ის დაუზიანებელი სახით ექსტრაქციაზე და შემდეგ მისი რესტრიქციული ენდონუკლეაზით დამუშავებაზე, რის შედეგადაც მიიღება მაღალმოლეკულური მასის მქონე დნმ-ის ფრაგმენტები. ამ ფრაგმენტების დაცილება ხდება პულსირებად ველში გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით. ამ მეთოდით შესაძლებელია ანალიზი ჩაუტარდეს 20 კილობაზიდან (Kb) რამდენიმე მეგაბაზამდე (Mb) ზომის ფრაგმენტებს. მიღებული პროფილი ყველა შტამისთვის ინდივიდუალურია და მისი დნმ-ის ანაბეჭდს წარმოადგენს, რადგან ერთი კლონიდან წარმოქმნილ შტამებს ერთნაირი რესტრიქციული საიტები გააჩნიათ და შესაბამისად მათი ანაბეჭდიც იდენტურია.

F. tularensis შემთხვევაში გამოყენებულ იქნა *Sallmonella typhimurium*-თვის შემუშავებული პროტოკოლი (PulseNet, PFGE Manual, 1999). რესტრიქციული ენდონუკლეაზები შერჩეული იყო სტატიის მიხედვით (Garcia Del Blanco N, et al. 2002).

1. წინასწარ მომზადებული და გასტერილებული უჯრედების სუსპენზიის ბუფერში (CSB: Tris 100 mM; EDTA 100 mM; pH 8.0) ხდებოდა ერთი უჯრედისაგან გაზრდილი ცოცხალი ბაქტერიების სუსპენდირება და განსაზღვრულ კონცენტრაციამდე მიყვანა - 610 ნმ ტალღის სიგრძეზე ოპტიკური სიმკვრივე (OD) 0.70-0.80.
2. 400 მკლ უჯრედულ სუპენზიას ემატებოდა 20 მკლ პროტეინაზა-K (20 მგ/მლ), 400 მკლ წინასწარ მომზადებული (TE, 1.2% Sea-Kem Gold Agarose, Cambrex, 1% SDS) და 55-60°C-მდე გაგრილებული აგაროზის გელი და მიღებული ნარევი ჩამოსხმებოდა სპეციალურ ყალიბებში.
3. გამყარებული აგაროზის ბლოკი თავსდება 5 მლ ლიზის ბუფერში (50mM Tris, 50mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosine), რომელსაც ემატებოდა 25 მკლ პროტეინაზა-K (20მგ/მლ) და ინკუბირდებოდა 55°C-ზე 2 საათის განმავლობაში. ამ ეტაპზე იწყებოდა აგაროზის ბლოკში ჩაყალიბებული უჯრედების კედლისა და ცილების დაშლის პროცესი.
4. ლიზისის დასრულების შემდეგ ბლოკები ირეცხებოდა 50°C-ზე 3-ჯერ დისტილირებულ წყალში და 3-ჯერ TE ბუფერში. საბოლოოდ აგაროზის ბლოკებში

რჩებოდა გასუფთავებული, დაუზიანებელი ბაქტერიული დნმ-ის ნატიური სახით მიღება.

5. დნმ-ის რესტრიქციისათვის აგაროზის ბლოკიდან ჩამოიჭრებოდა ვიწრო ზოლი (~2მმ), ემატებოდა სპეციფიკურ ბუფერში გახსნილი რესტრიქციული ენდონუკლეაზა (Xho1 ან BamH1, New England Biolabs (NEB)) და ინკუბირდებოდა 37°C, 3-4 სთ-ის განმავლობაში.
6. ბოლო ეტაპზე ხდებოდა მიღებული დნმ-ის ფრაგმენტების 1%-იან აგაროზის გელში (Sea-Kem Gold Agarose, Cambrex) ჩაყალიბება და CHEF-DR II, BioRad, აპარატის ელექტროფორეზის კამერაში ჩადგმა, სადაც მოთავსებული იყო წინასწარ მომზადებული 0.5-ჯერადი TBE ბუფერი (Tris 130 mM; EDTA 2.5 mM; ბორის მჟავა 45 mM). ელექტროფორეზი პულსირებად ველში (PFGE) შემდეგი პროგრამით მიმდინარეობდა:
 - a. საწყისი დრო - 0.1 წმ,
 - b. საბოლოო დრო - 10 წმ. (BamH1-თვის - 15 წმ),
 - c. ვოლტაჟი - 6.0,
 - d. რეაქციის სრული დრო - 15-20 საათი.
7. ელექტროფორეზის შემდეგ გელი იღებებოდა ეთიდიუმ ბრომიდის ხსნარით (100 მგ/ლ) და მიღებული PFGE პროფილის ვიზუალიზაცია ხდებოდა ტრანსილუმინატორის ულტრაიისფერი გამოსხივების მეშვეობით. შედეგების დაფიქსირება პოლაროიდისა და ციფრული კამერების მეშვეობით, ხოლო შეფასება და ანალიზი შესაბამისი პროგრამული უზრუნველყოფის უქონლობის გამო ვიზუალურად ხდებოდა.

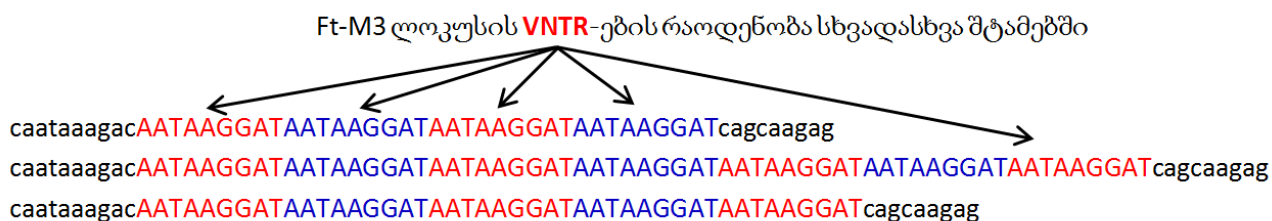
მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი

რაოდენობის ანალიზი – MLVA-25

მოლეკულური ტიპირების მეთოდი, ე.წ. MLVA (Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) დაფუძნებულია ბაქტერიული გენომის სხვადასხვა ლოკუსებში ერთმანეთის მიმყოლი განმეორებადი თანმიმდევრობების (VNTR) რაოდენობების

განსაზღვრაზე. გენომის ეს თავისებურება შტამებს შორის განსხვავებების გამოვლენის საშუალებას იძლევა. ასე მაგალითად, *F. tularensis* MLVA-25 სისტემის ერთ-ერთი ყველაზე ვარიანტული მარკერი Ft-M3 შეიცავს 9 ნუკლეოტიდიან თანმიმდევრობას, რომელიც სხვადასხვა რაოდენობითაა წარმოდგენილი სხვადასხვა შტამში.

სურათი 21. MLVA-25 სისტემის Ft-M3 VNTR-ების გადანაწილების მაგალითი.



ჩვენს მიერ გამოყენებულ MLVA სისტემაში შედიოდა *F. tularensis* 25 VNTR ლოკუსი (Johansson A., 2004) და B ტიპისათვის სპეციფიკური C1-C4 პრაიმერები (Johansson A., 2000; Farlow J., 2001), რომელიც ამავე დროს MLVA-25 სისტემის Ft-M19 ლოკუსს შეესაბამებოდა, თუმცა მისი განსხვავებული ზომისა და ფლუორესცენტული საღებავის გამო არ იყო ამოღებული კვლევიდან (ცხრილი 8).

PCR ამპლიფიკაციისათვის რევერსი და ფლუორესცენტულად მონიშნული ფორვარდ პრაიმერების 0.5-1 ნმოლი ნარევი და 10 ნგ საკვლევი დნმ ემატებოდა 2-ჯერად სარეაქციო არეს (Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen).

ცხრილი - 7. MLVA-25 სისტემის PCR სარეაქციო ნარევის მომზადების ცხრილი

რეაქტივი	საწყისი კონცენტრაცია	მოცულობა 1 რეაქციაზე	საბოლოო კონცენტრაცია
H ₂ O	-- --	3 მკლ	-- --
PCR სარეაქციო არე	2 ჯერადი	5.0 მკლ	1 ჯერადი
ფორვარდ და რევერს პრაიმერების ნარევი	10 მკმოლი	1 მკლ	1 მკმოლი
საკვლევი დნმ	10 ნგ	1 მკლ	10 ნგ
სარეაქციო არეს ჯამური მოცულობა:		10 მკლ	

ცხრილი - 8. MLVA-25 სისტემის VNTR-ებისა და მათი შესაბამისი პრაიმერების ჩამონათვალი. D2, D3, D4 CEQ-8000 ანალიზატორის ფლუორესცენტული ზონდები

MLVA მარკერი	ფორვარდ პრაიმერი ფლუორესცენტული ზონდებით	რევერს პრაიმერი	VNTR თანმიმდევრობა	VNTR ზომა
Ft-M1	GAGCTGGTCAAGTTTATTTAAGTA - D4	CAGGATTGCTTGAACATGATA	AAT	3
Ft-M2	TTTATGATAAAGGATGATTTAAAACAAAATA - D2	GCTTAAATCTCGCAATACCATGTAAT	TAAATA	6
Ft-M3	GTTTTACAGCTTGTCTCCTATCA - D3	CAAAAGCAACAGCAAAATTCACAAA	AATAAGGAT	9
Ft-M4	AAAAGGGCGGGTTACTGAGG - D4	GTATCAAATAGCGCAAAAATAACTGC	TTGTT	5
Ft-M5	TAGGCATGACAAACCCTGTAT - D2	CAGCTCGAACTCCGTCATAC	TTTCTACAAATATCTT	16
Ft-M6	TTTTGGGTTTTCTCTAAACATTTCTA - D3	CAATTCAGCGAAACCCTATCTTA	TTGGTGAACTTTCTTGCTCTT	21
Ft-M7	ATTGGGTGATTTGGATGGTTG - D4	CAGCTCGAACTCCGTCATAC	TTTCTACAAATATCTT	16
Ft-M8	AGTAATCTAGCCAAGGTAATA - D2	CAGCTCGAACTCCGTCATAC	TTTCTACAAATATCTT	16
Ft-M9	AAGGACCTATTTTTACATCAGT - D3	CAGCTCGAACTCCGTCATAC	TTTCTACAAATATCTT	16
Ft-M10	GTTGGCGAACCTAAAATAATAGC - D4	CAGCTCGAACTCCGTCATAC	TTTCTACAAATATCTT	16
Ft-M11	AAACCTACAATCAACATCTGACAAT - D2	TTGTTATATTAACCTCATCAGTTCAATTTA	AATTATAAAT	10
Ft-M12	CGCTAGATGGTGCTGATACTATCTT - D3	CCTGCTAGAAAACCCATATTTACAT	TAGCTTTTTT	10
Ft-M13	TTTGCAACTACTAGGTGTGGAGAT - D4	TTGATATTCCAAATGATCAAGTTTT	CTCCAGGACCAA	12
Ft-M14	ACCGCCATCTTTTCTATCATAAT - D2	AACCTTAAGTGATAAATATAACCCAAAA	TCATTA	6
Ft-M15	GCATGGACATGAGTGTCTATGGCGTAGATC - D3	GATAAAGGAATGTTTTAAATAATGTGATGTTTTGCATC	ATACTT	6
Ft-M16	AGGAAAGCATACCCAACATTATT - D4	CCAAAGATCGCGTGATT	TAAAAGTAAG	10
Ft-M17	GCTATAGCAGTAAATGTAGGCTCAA - D2	ACATATCGGTGGATCACTATCAA	TATTTA	6
Ft-M18	AACAGCCTTCAAACCACCTT - D3	CATAAAATACAGCTTCAATAAACAATCTT	CATTAA	6
Ft-M19	TCCGGTTGGATAGGTGTTGGATT - D4	AGGCGGAGATCTAGGAACCTTT	TAAATTTCTCATA	13
Ft-M20	GCATAACTTTTGAGACAATTGGTGCAGATGATC - D2	GACCGCCAGTATATGCTTGACCTTGACTCC	ATTATTTTGATC	12
Ft-M21	CCACAGCTAGCCAGACCAAAT - D3	AGTTTGGCGGAGCTAAT	TCAATTA	7
Ft-M22	GTCAAAATCTCAAGATGAGCAAATATTTGAATGGT - D4	GGAGTTTTTCTCGTCCGCTGTTAGTGATT	AAAAAT	6
Ft-M23	TGAGATGTGGAACCTTTATAGTTCAA - D2	TGTAACATAAAAGATAACTAATGGCAATTT	AAGTAGCATTGTCACGACCTCCT	23
Ft-M24	ATACGGTCTAATAATATTCCTGTCA - D3	ATTCATTTATAGATGCCTTTGTTACC	ATAAATTATTTATTTGATTA	21
Ft-M25	GTGGTCTTTAAGCGTCTTAGCAAGCTCGAC - D4	GGGTACCCATCCCATATGTAAGTACAAATGTAGC	GT	2
C1-C4	TCCGGTTGGATAGGTGTTGGATT - D2	CGCGGATAATTTAAATTTCTCATA		

ამპლიფიკაცია მიმდინარეობდა შემდეგ პირობებში:

საწყისი დენატურაცია	95°C	5 წთ	35 ციკლი
დენატურაცია	94°C	20 წმ	
პრაიმერ-სუბსტრატის დაკავშირება	58°C	20 წმ	
ამპლიფიკაცია	72°C	45 წმ	
საბოლოო ელონგაცია	72°C	5 წთ	
დაყოვნება	4°C		

შემდგომი ეტაპი გრძელდებოდა 8-არხიან გენეტიკურ ანალიზატორში (CEQ8000, Beckman Coulter). ამისათვის ფორვარდ პრიმერები წინასწარ იყო მონიშნული ამ სისტემისათვის შესაბამისი ფლუორესცენტული საღებავით D2, D3, ან D4, Well-Red Oligos, Sigma, Proliigo. ამპლიკონების ნარევი ზავდებოდა 1:5 და 1 მკლ ოდენობით ემატებოდა 39 მკლ SLS (Sample Loading Solution, Beckman Coulter) ხსნარს, რომელსაც წინასწარ ჰქონდა შერეული 0.25 მკლ D1 ფლუორესცენტული საღებავით მონიშნული 640bp მოლეკულური წონის სტანდარტი (DNA size standard-600, Beckman Coulter) და ჩამოსხმული იყო 96-ფოსოიან პლანშეტში. ბოლო ეტაპზე სარეაქციო ნარევის ემატებოდა ერთი წვეთი მინერალური ზეთი და იდგმებოდა გენეტიკურ ანალიზატორში CEQ 8000. ამ დანადგარში ელექტროფორეზი კაპილარებში მოთავსებულ თხევად პოლიმერში მიმდინარეობდა. ფლუორესცენტულად მონიშნული ამპლიკონები მაღალი ძაბვის (პროგრამა Frag-4) პირობებში მოლეკულური წონის მიხედვით განცალკევდებოდნენ.

ხოლო შედეგების ათვლის ფანჯარასთან მოხვედრის შემდეგ ლაზერული კამერა ფლუორესცენტულ ნათებას აფიქსირებდა.

რეაქციის დასრულების შემდეგ მიღებული შედეგები ამავე სისტემის ფრაგმენტული ანალიზის პროგრამაში გადამუშავებით და მოლეკულური წონის სტანდარტთან შედარებით, ამპლიკონის



სურათი 22. გენეტიკური ანალიზატორი CEQ 8000, Beckman Coulter

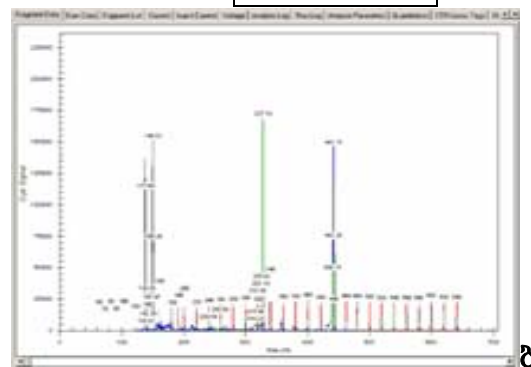
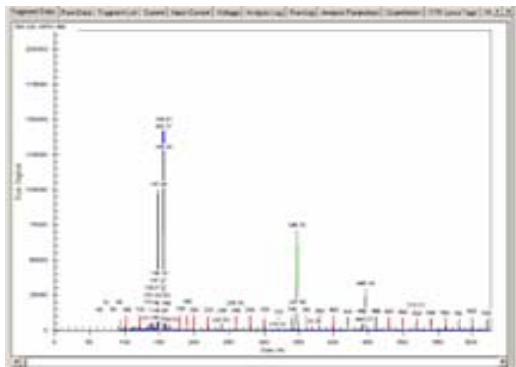
ზუსტი ზომა მიიღებოდა. კონკრეტული ლოკუსისთვის VNTR-ის ვარიაბელობის დადგენა მიღებული გენოტიპების რაოდენობის საფუძველზე ხდებოდა.

მულტიპლექსური MLVA - რამოდენიმე მარკერის ამპლიფიკაცია ერთ რეაქციაში

კვლევის შემდგომ ეტაპზე მულტიპლექსური ანალიზის შემუშავებისათვის მოხდა იმ მარკერების გაერთიანება, რომლებიც ქართული შტამებისათვის სპეციფიკურ ინფორმაციას იძლეოდნენ და განსხვავდებოდნენ ერთმანეთისაგან მიღებული პროდუქტის ზომის ან ფლუორესცენტული საღებავების მიხედვით. კერძოდ, შეირჩა Ft-M3 (D3) და Ft-M4 (D4) ვარიაბელური და B ტიპისათვის სპეციფიკური C1-C4 (D2) მარკერები. ამპლიფიკაციისათვის გამოყენებული იყო 1.25 ნმოლი Ft-M4, 2.5 ნმოლი Ft-M3 და 2.5 ნმოლი C1-C4 მარკერების პრაიმერების ნარევი. პრაიმერების რაოდენობის შერჩევა მათი ფლუორესცენტული საღებავების გამოსხივების ინტენსიურობის / ფლუორესცენტული აქტივობის მიხედვით ხდებოდა. სარეაქციო ნარევი და რეაქციის პირობები უცვლელი დარჩა.

ცხრილი - 9. MLVA-25 სისტემის მულტიპლექსური PCR სარეაქციო ნარევის მომზადების ცხრილი

რეაქტივის დასახელება	საწყისი კონცენტრაცია		მოცულობა 1 რეაქციაზე	საბოლოო კონცენტრაცია	
H ₂ O	--	--	2.0 მკლ	--	--
PCR სარეაქციო არე	2	ჯერადი	5.0 მკლ	1	ჯერადი
M3 ფორვარდ და რევერს პრ.-ების ნარევი	10	მკმოლი	1 მკლ	1	მკმოლი
M4 ფორვარდ და რევერს პრ.-ების ნარევი	10	მკმოლი	0.5 მკლ	0.5	მკმოლი
საკვლევი დნმ	10	ნგ	1 მკლ	10	ნგ
სარეაქციო არეს ჯამური მოცულობა:			10 მკლ		



სურათი 23. მულტიპლექსური MLVA-25 რეაქციის ელექტროფეროგრამები

ა) M3, M4, M25, C1-C4; ბ) M3, M4, C1-C4 მარკერები

მულტიპლექსური MLVA-11 სისტემა

მულტიპლექსური MLVA-11 იმავე VNTR ლოკუსების საფუძველზე შემუშავდა, რაც MLVA-25 სისტემაში იყო გამოყენებული (Vogler et al. 2009a). ამისთვის, MLVA-25 სისტემიდან შერჩეული იყო 10 ყველაზე მაღალი ვარიაბელურობის მქონე VNTR მარკერი: Ft-M02, Ft-M03, Ft-M04, Ft-M05, Ft-M06, Ft-M10, Ft-M20, Ft-M22, Ft-M23 და Ft-M24 (Johansson et al. 2004). Ft-M20 ლოკუსი ორად გაიყო: Ft-M20A და Ft-M20B, აქედან პირველი შეიცავდა ადრე აღწერილ 12 ნუკლეოტიდიან VNTR თანმიმდევრობას და დათიშვას იძლეოდა ქვესახეობების დონეზე, ხოლო მეორე დამატებით მოიცავდა 200 bp ჩართულ თანმიმდევრობას და ვარიაბელური იყო მხოლოდ *F. tularensis* ტიპი A.II და *F. tularensis* ქვესახეობა *novicida* შტამებისათვის, ხოლო ყველა სხვა *F. tularensis* იზოლატებისათვის მონომორფულ 153 bp PCR პროდუქტს იძლეოდა.

ცხრილი - 10. MLVA-11 სისტემის პრაიმერები, PCR სარეაქციო ნარევი, პრაიმერის კონცენტრაცია რეაქციაში და ფლუორესცენტული ზონდები ABI გენეტიკური ანალიზატორისათვის.

MLVA ლოკუსი	პრაიმერი	პრაიმერის თანმიმდევრობა (5'-3')	PCR სარეაქციო ნარევი	კონცენტრაცია (მკმოლი 1 ⁻¹)	ფლუორ. ზონდი
Ft-M22	Ft-M22-2F	gtggaatgcaaaaacaatatcgaggaacttta	1A	0.075	6FAM
	Ft-M22-2R	gtttttctcgtccgctgttagtgattttacatc	1A	0.075	None
Ft-M23	Ft-M23-2F	gctggattattaaagcatatgacagcagtagg	1A	0.2	NED
	Ft-M23-2R	gttcctcaggtttccaagttaattgattttatt	1A	0.2	None
Ft-M24	Ft-M24-2F	gaatcttaatccatacgcctcaataatctctgcaat	1A	0.8	NED
	Ft-M24-2R	gttggtactatggcctatagcggatattattcagt	1A	0.8	None
Ft-M03	Ft-M03-2F	gcacgctgtctcctatcatctctctgtagtc	1B	0.2	HEX
	Ft-M03-2R	gaacaacaaaagcaacagcaaaattcacaaaa	1B	0.2	None
Ft-M20A	Ft-M20-2AF*	gtatatcttggaaataagccggagttagtggtct	2	0.1	6FAM
	Ft-M20-2AFcold*	gtatatcttggaaataagccggagttagtggtct	2	0.1	None
	Ft-M20-2AR†	gcaataactttatcaccttattgtagctgctctgc	2	0.2	None
Ft-M10	Ft-M10-2F	gctaatttttcatattatctccattttactttttg	2	0.15	HEX
	Ft-M10-2R‡	gctcagctcgaactccgcatacactcttc	2	0.15	None
Ft-M05	Ft-M05-2F	gtttgttagccaataaacaagaagtgaataatg	2	0.6	NED
	Ft-M05-2R‡	gctcagctcgaactccgcatacactcttc	2	0.6	None
Ft-M04	Ft-M04-2F	gcgcgctatctaactaattttatattgaaacaatcaat	3A	0.2	6FAM
	Ft-M04-2R	gcaaatataccgtaatgccacctatgaaaactc	3A	0.2	None
Ft-M20B	Ft-M20-2BF†	gggtgataaagttattgttaattgggtgacttatgaa	3A	0.2	None
	Ft-M20-2BR	gtaactactgaccgccagttatgctgacct	3A	0.2	HEX
Ft-M06	Ft-M06-2F	gttttgggtaactgccaacaccataact	3A	0.6	NED
	Ft-M06-2R	gcaattcagcgaaacctctctgacctc	3A	0.6	None
Ft-M02	Ft-M02-2F	gctgctgtggctgtaaatgttgctatgct	3B	0.2	6FAM
	Ft-M02-2R	gcagggcacaattcttgacctcagg	3B	0.2	None

* სიგნალის შემცირებისა და მულტიპლექსური ანალიზის გაძლიერების მიზნით 6FAM-ზონდით მონიშნული და მოუნიშნავი (cold) Ft-M20-2AF პრაიმერები თანაბარი რაოდენობით იყო დამატებული PCR (2) ნარევიში.

† Ft-M20-2AR და Ft-M20-2BF პრაიმერების ურთიერთგადამფარავი თანმიმდევრობის გამო, ისინი სხვადასხვა PCR რეაქციაში უნდა იყვნენ გამოყენებულნი.

‡ Ft-M05-2R და Ft-M10-2R პრაიმერებს ერთი და იგივე თანმიმდევრობა აქვთ.

შერჩეული 11 VNTR ლოკუსის ამპლიფიკაცია 3 მულტიპლექსურ და 2 ჩვეულებრივ PCR რეაქციაში ხდებოდა, რომლებიც საბოლოოდ კაპილარული ელექტროფორეზისთვის სამ ნარევეში ერთიანდებოდა (ცხრილი 10). სარეაქციო ნარევეში შედიოდა 1x PCR ბუფერი (Invitrogen), 0.2 მმოლი MgCl₂ (Invitrogen), 20 მკმოლი დეზოქსინუკლეოტიდ ტრიფოსფატები (dNTP) (Invitrogen), 0.8 U Platinum *Taq* დნმ პოლიმერაზა (Invitrogen), პრაიმერები (ცხრილი 10), 1 მკლ ნიმუშის დნმ და წყალი ნარევის საბოლოო მოცულობამდე, 10 მკლ-მდე მისაყვანად.

ამპლიფიკაცია ტარდებოდა თერმოციკლერში TC-512, Techne, შემდეგი პირობებით:

საწყისი დენატურაცია	94°C	5 წთ	35 ციკლი
დენატურაცია	94°C	30 წმ	
პრაიმერ-სუბსტრატის დაკავშირება	58°C	30 წმ	
ამპლიფიკაცია	72°C	30 წმ	
საბოლოო ელონგაცია	72°C	5 წთ	
დაყოვნება	4°C		

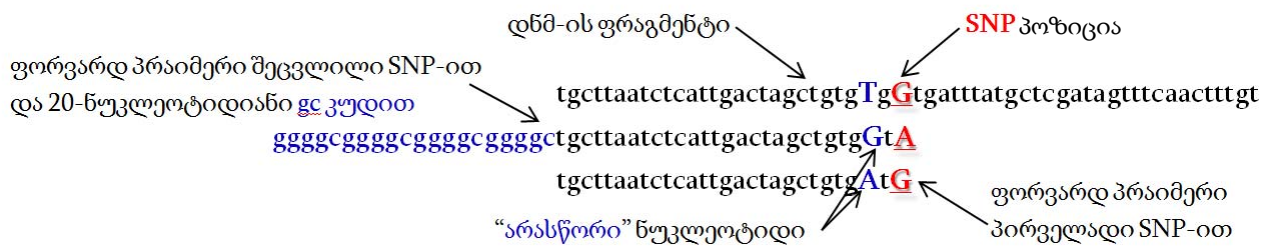
MLVA PCR პროდუქტების ვიზუალიზაცია Applied Biosystems 3100 ავტომატურ ფლოუორესცენტულ კაპილარულ დნმ სექვენატორზე ტარდებოდა. ელექტროფორეზის ნარევი 1 შეიცავდა PCR პროდუქტებს 1A და 1B რეაქციებიდან და ზავდებოდა წყალში პროპორციით 2 : 1 : 97. მე-3 ნარევეში შედიოდა PCR პროდუქტები 3A და 3B რეაქციებიდან იმავე განზავებით 2 : 1 : 97. მეორე ნარევეში შედიოდა მხოლოდ მე-2 რეაქციის PCR პროდუქტები და ზავდებოდა 1 : 49. თითოეული განზავებული ნარევის 0.5 მკლ ემატებოდა 9.45 მკლ HiDi ფორმამიდისა და 0.05 მკლ ROX ზონდით მონიშნული მოლეკულური წონის მარკერის (50–1000 bp) შემცველ სარეაქციო არეს. შედეგების ანალიზი GeneMapper, Applied Biosystems პროგრამით ხდებოდა.

ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (Single Nucleotide Polymorphism (SNP)):

ერთეული ნუკლეოტიდის პოლიმორფიზმის, ანუ ე.წ. SNP ლოკუსების ამორჩევა სრული გენომური თანმიმდევრობების შედარების საფუძველზე ხდებოდა.

გათვალისწინებული იყო შემდეგი კრიტერიუმები: მოცემული SNP ლოკუსი ყველა შტამში უნდა ყოფილიყო წარმოდგენილი; სამ-ვარიანტიანი, ერთმანეთთან 11 bp მანძილზე ახლოს მდებარე და განმეორებად უბნებში ნანახი SNP ლოკუსები ამოღებული იყო ანალიზიდან.

ამ კრიტერიუმების გათვალისწინებით შემუშავდა SNP გენოტიპირების ტესტები, რომლებიც დიზაინირებული იყო როგორც SYBR Green პლატფორმაზე დამყარებული real-time PCR ანუ ე.წ. melt-MAMA (Mismatch Amplification Mutation Assay) ანალიზისათვის, ასევე გელ-ელექტროფორეზით მიმდინარე PCR რეაქციისათვისაც. მეთოდი ეყრდნობოდა SNP ალელების სპეციფიკური ორი ფორვარდ პრაიმერის კონკურენტულ ამპლიფიკაციას, რომელთაც SNP პოზიციის წინ ხელოვნურად არასწორი ნუკლეოტიდი ჰქონდათ დამატებული, ხოლო ერთერთ ფორვარდ პრაიმერზე დამატებით 20-ნუკლეოტიდიანი GC კუდი იყო მიმაგრებული (სურ. 24).



სურათი 24. SNP ფორვარდ პრაიმერების კონკურენტულობის პრინციპი

ამრიგად, ამპლიკონის სინთეზირებისას უპირატესობა საკვლევ დნმ-ში არსებული SNP ვარიანტის შესაბამის ფორვარდ პრაიმერს ჰქონდა, რომელსაც მატრიცასთან დაკავშირებაში მხოლოდ ერთი ნუკლეოტიდის შეუსაბამობა უშლიდა ხელს, მაშინ როცა მეორე ფორვარდ პრაიმერს ორი არასწორი ნუკლეოტიდი (SNP და ხელოვნური შეცდომა) ძლიერ უზღუდავდა კონკურენტუნარიანობას. ამასთან პირველივე ციკლის შემდეგ სინთეზირებული ამპლიკონი შემდგომში დომინანტური სუბსტრატი ხდება, რაც კიდევ უფრო ზრდის სპეციფიკური ალელის შესაბამისი ფორვარდ პრაიმერის უპირატესობას.

სინთეზირებული ამპლიკონის ზომა განსხვავდებოდა ამპლიფიკაციაში ჩართული ფორვარდ პრაიმერის მიხედვით. პირობითად, ყველა შეცვლილი SNP ვარიანტის პრაიმერს 20-ნუკლეოტიდიანი GC კუდი ჰქონდა დამატებული. ამიტომ, დეტექციის

ეტაზე შესაძლებელი იყო ამპლიკონების ზომაში განსხვავების დაჭერა როგორც პროდუქტის ლღობის ტემპერატურის ანალიზით, ასევე ფრაგმენტების გელ ელექტროფორეზის საშუალებით.

პრაიმერების დიზაინი Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) პროგრამის მეშვეობით ხდებოდა. შეძლებისდაგვარად ყველა პრაიმერის ლღობის ტემპერატურა იყო გათანაბრებული, ხოლო ურთიერთ და თვით კომპლემენტური სტრუქტურების წარმოქმნა - გამორიცხული. პრაიმერების ვალიდაციისათვის რეაქციაში ფორვარდ პრაიმერები GC კუდით და კუდის გარეშე ემატებოდა სხვადასხვა კონცენტრაციით (1:1 და 1:5) და ცალცალკე, ხოლო რევერს პრაიმერი და PCR რეაქციის სხვა კომპონენტები უცვლელი რჩებოდა. შედეგებიდან გამომდინარე ცდა შესაძლოა განმეორებულიყო ფორვარდ პრაიმერების განსხვავებული კონცენტრაციებით (Birdsell DN et al., 2012). ვალიდაციის შედეგად ყველა პრაიმერისთვის შერჩეული იყო ოპტიმალური კონცენტრაცია (ცხრილი 12).

სარეაქციო ნარევის გამოთვლისათვის ქვემოთ მოცემული ცხრილი გამოიყენებოდა:

ცხრილი - 11. SNP ტიპირებისთვის PCR სარეაქციო ნარევის მომზადების ცხრილი

რეაქტივის დასახელება	საწყისი კონცენტრაცია		მოცულობა 1 რეაქციაზე	საბოლოო კონცენტრაცია	
H ₂ O	--	--	3.4 მკლ	--	--
PCR სარეაქციო არე	2	ჯერადი	5.0 მკლ	1	ჯერადი
ფორვარდ პრაიმერი პირველადი SNP-ით	10	მკმოლი	0.2 მკლ	0.2	მკმოლი
ფორვარდ პრაიმერი წარმოქმნილი SNP-ით	10	მკმოლი	0.2 მკლ	0.2	მკმოლი
რევერს პრაიმერი	10	მკმოლი	0.2 მკლ	0.2	მკმოლი
საკვლევი დნმ	10	ნგ	1 მკლ	10	ნგ
სარეაქციო არეს ჯამური მოცულობა:			10 მკლ		

სარეაქციო ნარევი გელ-ელექტროფორეზით ანალიზის შემთხვევაში იყო Taq PCR Master Mix Kit (1000 U), # 201445, Qiagen, ხოლო Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (2000), #204076, Qiagen, ფლუორესცენტული PCR რეაქციის დროს. პირველადი და წარმოქმნილი SNP ფორვარდ პრაიმერების კონცენტრაციები იცვლებოდა ცხრილი 12-ის მიხედვით და შესაბამისად იცვლებოდა რეაქციაში წყლის რაოდენობა. სარეაქციო არეს საბოლოო მოცულობა 10 მკლ იყო.

რეაქციებში კონტროლებად გამოყენებული იყო სექვენირებული ქართული შტამი F0673, რომელიც ყველა რეაქციაში შეცვლილ SNP ვარიანტს ასინთეზირებდა და LVS საკონტროლო შტამი, რომელიც ქართული შტამებისათვის სპეციფიკური ყველა SNP რეაქციაში პირველადი SNP ვარიანტით ხასიათდებოდა.

PCR რეაქციის პირობები შემდეგი იყო:

საწყისი დენატურაცია	95°C	10 წთ	35 ციკლი
დენატურაცია	95°C	15 წმ	
პრაიმერ-სუბსტრატის დაკავშირება	55°C	1 წთ	
ფლუორესცენტული PCR-ის შემთხვევაში:			
დნმ პროდუქტის ლღობის T ანალიზი, 0.2°C/წთ	72°C	5 წთ	

ფლუორესცენტული PCR რეაქციის დროს SYBR Green საღებავი დნმ-ის ორჯაჭვიან სტრუქტურას უკავშირდებოდა და სინჯარაში პროდუქტთან ერთად ფლუორესცენტული ნათების მომატებას იწვევდა. ამპლიფიკაციის დასრულებისთანავე იწყებოდა ამპლიკონების დისოციაციის პროცესი ტემპერატურის 60°C-დან 95°C-მდე თანდათანობითი (0.2°C/წთ) მატებით, და ფლუორესცენტული აქტივობის უწყვეტი გაზომვით. გარკვეულ ტემპერატურაზე, რომელიც დნმ-ის მოცემული ფრაგმენტის ლღობის ტემპერატურას შეესაბამებოდა, ამპლიკონების დნმ-ის ორჯაჭვიანი სტრუქტურა იშლებოდა და სინჯარაში SYBR Green-ის ფლუორესცენტული ნათება წყდებოდა. დისოციაციის მრუდების პროგრამული დამუშავების შედეგად მიიღებოდა ლღობის ტემპერატურული პიკები. პირველადი SNP ვარიანტის მქონე შტამის პროდუქტი ლღობის უფრო დაბალი ტემპერატურით ხასიათდებოდა, ვიდრე შეცვლილი SNP მუტაციის მქონე შტამი, რომლის პროდუქტსაც პრაიმერზე მიმაგრებული GC კუდი ჰქონდა დამატებული (ცხრილი 12).

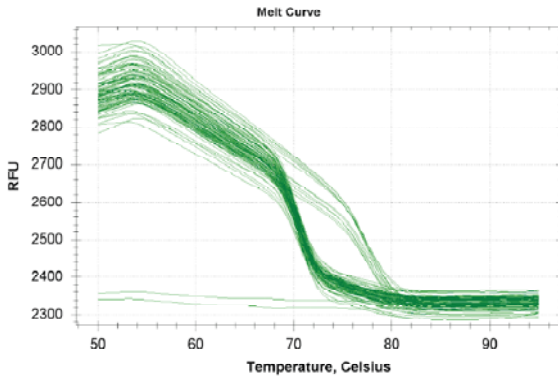
ცხრილი - 12. Melt-MAMA და გელ-ელექტროფორეზით ანალიზისათვის შერჩეული კანონიკური SNP პრაიმერები: SNP ქვეჯგუფების შესაბამისი ფორვარდი შეცვლილი SNP-ით (Der), ფორვარდი პირველადი SNP-ით (Anc) და რევერსი (Con) ფლუორესცენტული (Melt MAMA) და გელის (Gel assay) ანალიზისთვის

SNP ქვეჯგუფი	პოზიცია SCHU S4 გენომში †	SNP ნუკლ. (Der/Anc)	პრაიმერი	ანალიზის ტიპი	პრაიმერების თანმიმდევრობები ‡	პრაიმ. კონც. (µM)	პრაიმ. დაკავშირ. ტემპ. (°C)	ლღობის ტემპ. T _m (°C)	
B.Br.026	1484645	A/C	Der	Melt MAMA,	GAAACTTATTTGTTCTAAGACAGTGACAcTA	0.800	55	73.1	
			Anc	Gel assay	ggggcggggcggggcAAACTTATTTGTTCTAAGACAGTGACAgTC	0.200			79.7
			Con		GCATTGAGTTTGACAGGGTTGC	0.200			
B.Br.027	1329722	T/G*	Der	Melt MAMA	ggggcggggcggggcggggcCATGCCAGGCACTACAATTGATAGTaTA	0.200	55	78.2	
			Anc		TGCCAGGCACTACAATTGATAGTtTC	1.000			73.6
			Con		TATACTTCTGACCATGGCGTTCAAAAT	0.200			
B.Br.027	1872800	A/G	Der	Gel assay	ggggcggggcggggcggggcCTGGTTTACTATTACTTACTTTTTCGTATTtTA	0.200	55		
			Anc		TGGTTTACTATTACTTACTTTTTCGTATTtTG	1.000			
			Con		ATATGTAATAATGCACATTGACCTCTCC	0.200			
B.Br.028	212729	T/G	Der	Melt MAMA,	ggggcggggcggggcggggcAAATTAGTTCAAATGTTAAATTTGATcCT	0.200	55	75.8	
			Anc	Gel assay	AAATTAGTTCAAATGTTAAATTTGATaCG	0.200			67.7
			Con		CAAAATAAATCCCGTTGAGAATAGAA	0.200			
B.Br.029	1185519	A/G	Der	Melt MAMA	ggggcggggcggggcggggcTGCTTAATCTCATTGACTAGCTGTGgTA	0.200	55	78	
			Anc		TGCTTAATCTCATTGACTAGCTGTGaTG	1.000			70
			Con		ACAAAGTTGAAACTATCGAGCATAAAATC	0.200			
B.Br.029	483327	T/G	Der	Gel assay	ggggcggggcggggcggggcGAATTCCTTTGTAAGGCATCACCTAAgAT	0.200	55		
			Anc		TGAATTCCTTTGTAAGGCATCACCTAAtAG	1.000			
			Con		TGTTGCTAAGCCGATGCACG	0.200			
B.Br.030	928335	T/G	Der	Melt MAMA,	ggggcggggcggggcggggcTGTTGGGTCAAAGAGAGAAGTgTT	0.200	55	78.2	
			Anc	Gel assay	ATTGTTGGGTCAAAGAGAGAAGTaTG	0.200			70
			Con		GCCACCAAAGAATACAGAGTAGTCAT	0.200			
B.Br.031	1634565	A/G	Der	Melt MAMA,	ggggcggggcggggcggggcGCACCAATCGTATCTAATTGATcCA	0.400	55	79	
			Anc	Gel assay	GCACCAATCGTATCTAATTGATtCG	0.200			70
			Con		AACCTTGCTAAAACAAATGCTGTTGC	0.200			
B.Br.032	283540	A/G*	Der	Melt MAMA,	ggggcggggcggggcggggcTGCTAAACCTACAGTAATCAGAAGTATtAT	0.200	55	72	
			Anc	Gel assay	TGCTAAACCTACAGTAATCAGAAGTATcAC	0.600			68.4
			Con		GCTAAATTTTAGTAAGATAAAAAGTGAAGTAGTG	0.200			

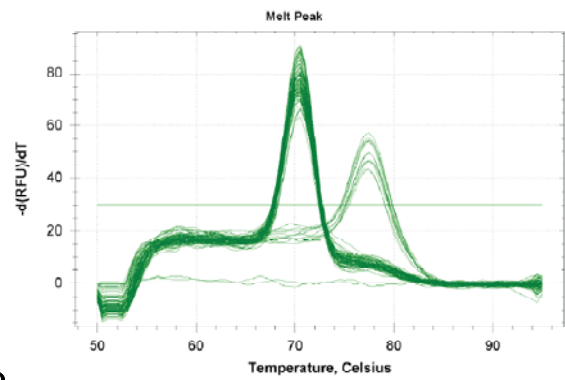
† - პოზიცია SCHU-S4 გენომში მოცემულია რეფერალური შტამის NC_006570 მიხედვით;

* - პრაიმერები დიზაინირებულია დნმ-ის კომპლემენტარულ ჯაჭვზე;

‡ - პრაიმერების თანმიმდევრობებში კუდები და „არასწორი“ ნუკლეოტიდები აღნიშნულია პატარა სიმბოლოებით.



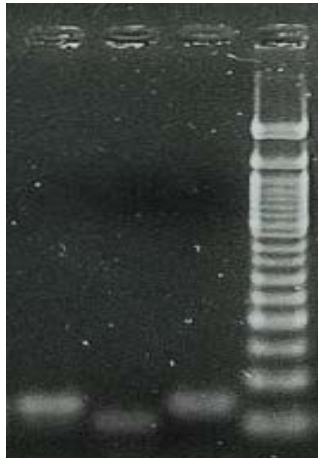
ა



ბ

სურათი 25. ა - ლღობის მრუდი; ბ - ლღობის პიკი

გელ-ელექტროფორეზის შემთხვევაში 2.5%-იანი აგაროზის გელი იდგმებოდა ჰორიზონტალური ელექტროფორეზის აპარატში, სადაც წინასწარ იყო მოთვსებული TBE



სურათი 26. სხვადასხვა SNP ალელების განსხვავებული ზომები

(Tris 130 mM; EDTA 2.5 mM; ბორის მჟავა 45 mM) ბუფერი. ელექტროფორეზი 2,5 საათის განმავლობაში მიმდინარეობდა 100 ვოლტი ძაბვის პირობებში. გელის შეღებვა ხდებოდა ეთიდიუმ ბრომიდის ხსნარში (100 მგ/ლ), ხოლო შედეგების ვიზუალიზაციისათვის ტრანსილუმინატორის ულტრაიისფერი გამოსხივება გამოიყენებოდა. შედეგები ფიქსირდებოდა პოლაროიდისა და ციფრული კამერების მეშვეობით. შედეგად, პირველადი SNP ალელი 20 ნუკლეოტიდით უფრო პატარა ფრაგმენტს იძლეოდა შეცვლილი SNP ალელის მქონე შტამთან შედარებით.

გენომის სექვენირება

გენომური დნმ-ის ექსტრაქცია

სექვენირებისათვის შერჩეული შტამიდან გენომური დნმ-ის ექსტრაქცია ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტის მიერ მოწოდებული პროტოკოლის მიხედვით ხდებოდა.

- ერთი კოლონიიდან მიღებული ორდღიანი კულტურა, რომელიც ორ-სამ პეტრის ფინჯან შოკოლადისებურ ნიადაგზე იყო გათესილი, გადატანილ იქნა 11 მლ TE ბუფერში, რომელსაც დამატებული ჰქონდა 11 მკლ RNase A (100 მგ/მლ).

2. ერთგვაროვანი სუსპენზია თავდაპირველად თავსდება თხევად აზოტში 1 წთ-ით, სრულ გაყინვამდე, ხოლო შემდეგ 65°C წყლის აბაზანაში 5-10 წთ-ით, სრულ გამოდნობამდე. ეს პროცედურა მეორდება 2-3-ჯერ.
3. სუსპენზია გრილდება ოთახის ტემპერატურამდე, ემატებოდა 225 მკლ 20% SDS და 45 მკლ პროტეინაზა K (20 მგ/მლ) და ფრთხილი შერევის შემდეგ და იდგმებოდა წყლის აბაზანაში 55°C ინკუბაციაზე 2 საათით.
4. ინკუბაციის დასრულების შემდეგ ნარევს ემატებოდა 2.5 მლ 5 M NaCl და 5 წთ განმავლობაში ფრთხილი მოძრაობით ხდებოდა მისი შერევა.
5. შემდგომ ეტაპზე ნარევს ემატებოდა 1.4 მლ CTAB/NaCl (10% ჰექსა-დეცილ-ტრიმეთილ-ამონიუმ ბრომიდი (CTAB), 0.7 M NaCl ხსნარში) და ისიც ფრთხილად ერეოდა 10 წთ განმავლობაში.
6. ამის შემდეგ ხდებოდა ნარევის 10 წთ-იანი ინკუბაცია 65°C წყლის აბაზანაში.
7. ინკუბაციის შემდეგ ნარევი 5 წთ-ით ჩერდებოდა ოთახის ტემპერატურაზე, სწრაფად ემატებოდა 12 მლ წინასწარ მომზადებული ქლოროფორმისა და იზოამილის (24:1) ნარევი და ნელი მოძრაობით ინჯღრეოდა 10 წთ-ის განმავლობაში.
8. ხდებოდა ნარევის ცენტრიფუგირება 4°C-ზე 10 წთ-ის განმავლობაში 4000 ბრ/წთ (3220×g) სიჩქარით;
9. გამჭვირვალე ფაზის ახალ სინჯარაში გადატანის შემდეგ ისევ ემატებოდა 12 მლ ქლოროფორმ:იზოამილის (24:1) ნარევი, ერეოდა და ხდებოდა ცენტრიფუგირება 4000 ბრ/წთ (3220×g) 4°C-ზე 10 წთ განმავლობაში.
10. ზედა ფაზა იფილტრებოდა 0.22 მკმ ფილტრში და ახალ სინჯარაში გადატანის შემდეგ ემატებოდა 0.6 მოცულობა იზოპროპანოლი, კარგად ერეოდა დნმ-ის სრულ გამოლექვამდე და იდგმებოდა -20°C მაცივარში მთელი ღამით.
11. მეორე დღეს ხდებოდა სინჯარის ცენტრიფუგირება 4000 ბრ/წთ (3220×g) სიჩქარეზე 4°C-ზე 30 წთ განმავლობაში.
12. სუპერნატანტის გადაღვის შემდეგ ნალექს ემატებოდა 1 მლ 70% ეთანოლი და ცენტრიფუგირდებოდა 4°C 10 წთ განმავლობაში 4000 ბრ/წთ (3220×g) სიჩქარეზე.

13. სუპერნატანტის გადაღვის შემდეგ, ნალექი შრებოდა, ემატებოდა 300 მკლ სტერილური TE ბუფერი და იდგმებოდა 4°C-ზე მთელი ღამით, დნმ-ის სრულ გახსნამდე.
14. მიღებული მაღალკონცენტრირებული გენომური დნმ მოწმდებოდა სტერილობაზე: 15 მკლ (5%) ეწვეთებოდა შოკოლადისებურ ცისტეინიან აგარს და ხდებოდა მისი ინკუბაცია 37°C-ზე 72 სთ-ით. ნაზარდის წარმოქმნის შემთხვევაში დნმ ხელმეორედ იფილტრებოდა 0.2 მკმ ფილტრში.

სრული გენომის სექვენირება

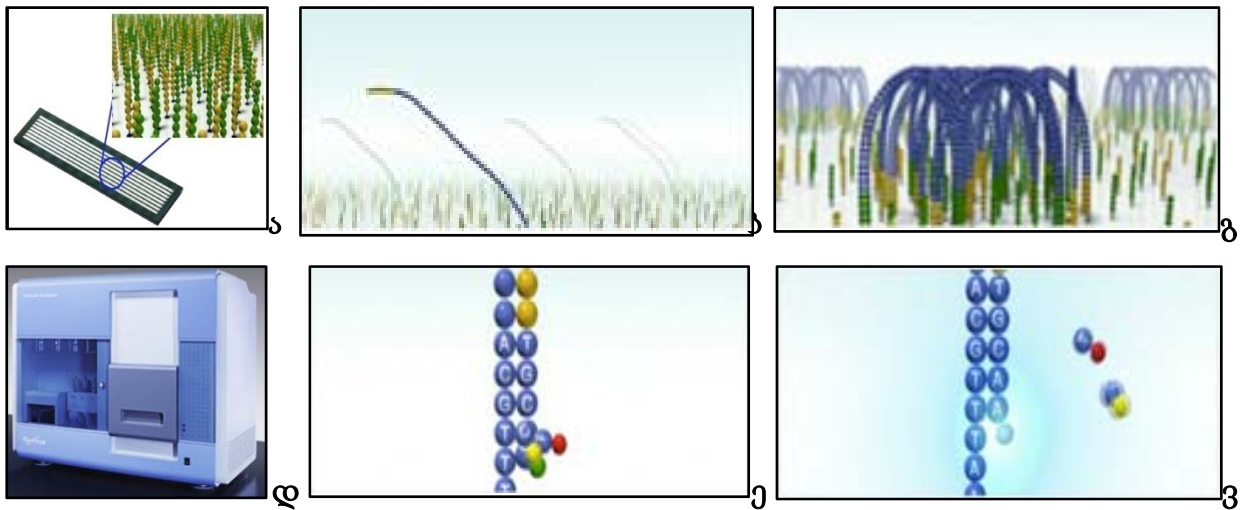
სრული გენომის სექვენირებისათვის დკსჯეც-ის ნაციონალური კოლექციიდან შერჩეული იყო ერთერთი ყველაზე გავრცელებული MLVA პროფილის მქონე *F. tularensis* ქართული შტამი (F0673), რომლიდანაც მოხდა გენომური დნმ-ის ექსტრაქცია და გადაიგზავნა ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტში (NAU). გენომის სექვენირება ჩატარდა მოკლე ფრაგმენტების (50b) წაკითხვის ტექნოლოგიით Illumina Genome Analyzer II, San Diego, CA, დანადგარის გამოყენებით (სურ. 27-დ) გადაფარვის ძალიან მაღალი მაჩვენებლით (1.076X). სექვენირებული *F. tularensis* ქართული შტამის (F0673) თანმიმდევრობა გადაეცა გენომური ბანკის მონაცემთა ბაზას (GenBank, SRP003002.2).

დღეისათვის დნმ-ის სრული გენომის სექვენირებისათვის ახალი თაობის რამდენიმე განსხვავებული ტექნოლოგია გამოიყენება. Illumina სექვენირების მთელი პროცესი პატარა ზომის ჩიპზე (სურ. 27-ა) მიმდინარეობს, რომლის მყარ სუბსტრატზე დნმ-ზონდებია მიმაგრებული. თავდაპირველად დნმ-ის ფრაგმენტირებული მოლეკულები სწორედ ამ ზონდებს უკავშირდებიან და ხიდაკების წარმოქმნით ამპლიფიცირდებიან ისე, რომ კლონური ფრაგმენტების ლოკალურ კოლონიებს ქმნიან. შემდეგ ეტაპზე სარეაქციო არეს ემატება პაიმერი და ოთხი განსხვავებული შექცევადი ფლუორესცენტული ტერმინატორული ნუკლეოტიდი (A, C, T, G). ციკლის დასრულების შემდეგ ზედმეტი ნუკლეოტიდები გამოირეცხება. ლაზერული კამერა აფიქსირებს ახალი მიმაგრებული ნუკლეოტიდის ფლუორესცენტული ზონდის ნათებას. ყოველი ციკლის შემდეგ დნმ მატრიცაზე მხოლოდ ერთი ნუკლეოტიდური ფუძის მიმატება ხდება.

ყოველი ციკლის წინ 3' ბოლოზე მიმაგრებული ფუორესცენტული ზონდები ქიმიური დამუშავებით შორდება და ახალი ნუკლეოტიდის მიერთების საშუალებას იძლევა. პროცესი გრძელდება მანამ, სანამ დნმ-ის მონაკვეთი სრულად არ წაკითხება (სურ. 27-ბ,გ,ე,ვ). რეაქციის ბოლოს ასობით მილიონი წაკითხული თანმიმდევრობა სპეციალური კომპიუტერული პროგრამებით მუშავდება და ხდება საბოლოო სრული ჯაჭვის აწყობა, რომელიც ასობით ურთიერთგადაფარვადი ფრაგმენტების ანალიზის შედეგია.

გარდა სრული გენომის სექვენირებისა, Illumina ტექნოლოგია ხშირად გამოიყენება ისეთი რთული გენომური უბნების წასაკითხად, როგორცაა ჰომოპოლიმერები და განმეორებადი თანმიმდევრობები. რაკი ყოველი ციკლის განმავლობაში ოთხივე ნუკლეოტიდია წარმოდგენილი, ამგვარი ბუნებრივი კონკურენცია ამცირებს შეცდომების ალბათობას. ხოლო თითო-თითო ნუკლეოტიდის წაკითხვის შედეგად მიღებული თანმიმდევრობა უშეცდომო და სარწმუნო მონაცემების გარანტიაა. ამ ტექნოლოგიის ახალი აპარატები 150 ხ სიგრძის ფრაგმენტების წაკითხვის საშუალებას იძლევა.

სურათი 27. Illumina Genome Analyzer II (დ), ჩიპი მასზე მიმაგრებული დნმ ზონდებით (ა) და სექვენირების ტექნოლოგიის ეტაპების ამსახველი ილუსტრაციები (ბ, გ, ე, ვ).



მიღებული შედეგები

დიაგნოსტიკა

F. tularensis დიაგნოსტიკისათვის 2006 წლიდან დღემდე-ში გამოიყენება real-time PCR სისტემა. ამ მეთოდის საშუალებით დადასტურდა ყველა (103) სამუზეუმო შტამი და ასევე გამოკვლეულ იქნა სავსე სამუზეუმოების დროს მოპოვებული გარემო და პაციენტებიდან მიღებული კლინიკური ნიმუშები (ცხრილი 13). ტესტირებისას გამოყენებული იყო მაღალსპეციფიკური ნაკრებები *F. tularensis* Detection Kit Target 1 (T1), *F. tularensis* Detection Kit Target 2 (T2), Idaho Technology.

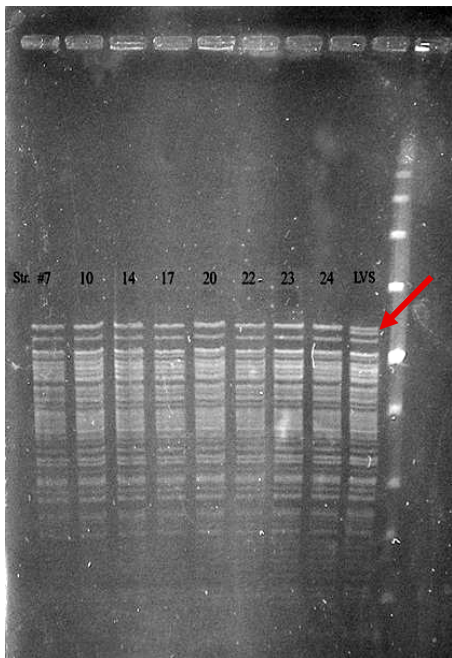
ცხრილი - 13. *F. tularensis* PCR დადებითი გარემო და კლინიკური ნიმუშები

ნიმუშის #	ნიმუშის ტიპი	T1	T2	თვე / წელი	კლინიკური / გარემო ნიმუშის წყარო	ნიმუშის მოპოვების ადგილი
08E-NCDC/ /02-06	გარემო	(+)	(+)	03/2008	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, Hm. otophila</i>	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC/ /02-06/C	იზოლატი	(+)	(+)	03/2008	ტკიპების ემულსია #06	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC/ /02-/B06/C	იზოლატი	(+)	(+)	03/2008	ბიოცდა #06,(ტკ. ემულსია #06)	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC/ /02-07	გარემო	(+)	(+)	03/2008	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, Hm. otophila</i>	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC/ /02-12	გარემო	(+)	(+)	03/2008	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, Hm. otophila</i>	კასპი, ს. ლამისყანა
08E-NCDC/ /02-/B10/C	იზოლატი	(+)	(+)	03/2008	ბიოცდა #10 (ტკ. ემულსია #12)	კასპი, ს. ლამისყანა
07H / /02-02	კლინიკური	(+)	(+)	01/2007	ზუზონის პუნქტატი	კასპი, ს. ზემო რენე
07H / /02-23	კლინიკური	(+)	(+)	01/2007	ზუზონის პუნქტატი	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC/ /78	გარემო	(+)	(+)	05/2008	ტკიპების ემულსია	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC/ /85	გარემო	(+)	(+)	05/2008	ტკიპების ემულსია	კასპი, ს. ზემო რენე
08H / /02-58	კლინიკური	(+)	(+)	09/2008	ზუზონის პუნქტატი	საგარეჯო, ს. წყაროსთავი
11E-NCDC/ /02-83	გარემო	(+)	(+)	03/2011	ტკიპების ემულსია, <i>Hm. otophila</i>	გორი, ს. ნადარბაზევი
11E-NCDC/ /02-90	გარემო	(+)	(+)	03/2011	ტკიპების ემულსია, <i>D. marginatus</i>	ცხინვალი, ს. ნოქოზა
11E-NCDC/ /02-117	გარემო	(+)	(+)	03/2011	ტკიპების ემულსია, <i>D. marginatus</i>	კასპი, ს. იგოეთი
11E-NCDC/ /02-/B10/C	იზოლატი	(+)	(+)	03/2011	ბიოცდა #10 (ტკ. ემულსია #82-89)	გორი, ს. ნადარბაზევი
11E-NCDC/ /02-/B14/C	იზოლატი	(+)	(+)	03/2011	ბიოცდა #14 (ტკ. ემულსია #108-120)	კასპი, ს. იგოეთი
11E-NCDC/ /02-83/C	იზოლატი	(+)	(+)	03/2011	ტკიპების ემულსია #83	გორი, ს. ნადარბაზევი
11E-NCDC/ /02-90/C	იზოლატი	(+)	(+)	03/2011	ტკიპების ემულსია #90	ცხინვალი, ს. ნოქოზა
11E-NCDC/ /02-117/C	იზოლატი	(+)	(+)	03/2011	ტკიპების ემულსია #117	კასპი, ს. იგოეთი
12E-NCDC/ /02-31	გარემო	(+)	(+)	05/2012	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, D. marginatus</i>	კასპი, ს. ზემო რენე
12E-NCDC/ /02-68	გარემო	(+)	(+)	05/2012	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, D. marginatus</i>	კასპი, ს. ქვემო ჭალა
12E-NCDC/ /02-69	გარემო	(+)	(+)	05/2012	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, H. sulcata</i>	კასპი, ს. ქვემო ჭალა
12E-NCDC/ /02-74	გარემო	(+)	(+)	05/2012	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, H. punctata</i>	კასპი, ს. ოკამი
12E-NCDC/ /02-92	გარემო	(+)	(+)	05/2012	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, D. marginatus</i>	გორი, ს. ტყვიავი

12E-NCDC/ /02-31/C	იზოლატი	(+)	(+)	05/2012	ტკიპების ემულსია #31	კასპი, ს. ზემო რენე
12E-NCDC/ /02-68/C	იზოლატი	(+)	(+)	05/2012	ტკიპების ემულსია #68	კასპი, ს. ქვემო ჭალა
12E-NCDC/ /02-69/C	იზოლატი	(+)	(+)	05/2012	ტკიპების ემულსია #69	კასპი, ს. ქვემო ჭალა
12E-NCDC/ /02-74/C	იზოლატი	(+)	(+)	05/2012	ტკიპების ემულსია #74	კასპი, ს. ოკამი
12E-NCDC/ /02-92/C	იზოლატი	(+)	(+)	05/2012	ტკიპების ემულსია #92	გორი, ს. ტყვიავი

გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში – (PFGE)

F. tularensis შტამების გენოტიპირებისათვის თავდაპირველად გამოყენებულ იქნა გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში, ეს მეთოდი ფართოდ არის აპრობირებული მრავალი ბაქტერიული აგენტის დიფერენცირებისათვის. ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ *F. tularensis* გენომი მაღალი კონსერვატიულობით გამოირჩევა. თუმცა იმის გათვალისწინებით, რომ ქართული შტამები ამ მეთოდით აქამდე არ გამოკვლეულა, საინტერესო იყო საქართველოში გავრცელებული პოპულაციის მონომორფულობა. ამის გამო დკსჯეც კოლექციაში არსებული *F. tularensis* 49 ქართულ (ცხრილი-14) და ცოცხალ ვაქცინალურ შტამზე (LVS) ჩატარდა PFGE ტიპირება ორი რესტრიქციული ენდონუკლეაზის (XhoI და BamHI) გამოყენებით (Garcia Del Blanco N, et al. 2002).



სურათი 28. *F. tularensis* PFGE, ენდონუკლეაზა Xho-I

PFGE ტიპირებამ ორივე რესტრიქციული ენდონუკლეაზის გამოყენებით არ გამოავლინა რაიმე განსხვავება ქართულ შტამებს შორის. ვიზუალური შეფასებით ყველა ნიმუშს იდენტური PFGE პროფილი აღმოაჩნდა. ერთადერთი დამატებითი რესტრიქციული ფრაგმენტი ჰქონდა XhoI ენდონუკლეაზით დაჭრილ ცოცხალ ვაქცინალურ შტამს (LVS) (სურ. 28).

PFGE ტიპირებით მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით გადაწყდა განსხვავებული მეთოდის გამოყენება, რომელიც შტამების უკეთესი დიფერენცირების საშუალებას მოგვცემდა.

ცხრილი - 14 . PFGE ტიპირებაზე გაშვებული შტამების ჩამონათვალი.

შტამის #	დნმ #	PFGE ცდა/ნიმუში	იზოლაგის წელი	შტამის იზოლაგის წყარო	კერა	რაიონი
4941/56-G	1	6.1	1956	მღრღნელი	კახეთი	დედოფლისწყარო
4947/56-G	2	7.8	1956	ექტოპარაზიტი	კახეთი	დედოფლისწყარო
4944/74-G	3	6.2	1974	ბიგა	შიდა ქართლი	ცხინვალი
867/77-G	4	7.2	1977	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ადიგენი
932/77-G	5	6.4	1977	ფრინველის ამონანთხევი	სამცხე-ჯავახეთი	ადიგენი
1263/78-G	6	6.3	1978	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
1803/80-G	7	9.1	1980	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
1935/80-G	8	7.3	1980	წყაროს წყალი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
1940/80-G	9	7.4	1980	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
1996/80-G	10	9.2	1980	მღრღნელი	შიდა ქართლი	ხაშური
1998/80-G	11	7.5	1980	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
2068/81-G	12	6.5	1981	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
2683/82-G	13	7.6	1982	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
2799/82-G	14	9.3	1982	მღრღნელი	შიდა ქართლი	გორი
2800/82-G	15	6.6	1982	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
2816/82-G	16	7.7	1982	მღრღნელი	შიდა ქართლი	გორი
2827/82-G	17	9.4	1982	წყალი	შიდა ქართლი	გორი
2828/82-G	18	7.1	1982	მღრღნელი	შიდა ქართლი	გორი
6141/86-G	19	6.7	1986	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
6176/86-G	20	9.5	1986	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
7149/87-G	21	6.8	1987	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
8120/90-G	22	9.6	1990	მღრღნელი	ქვემო ქართლი	დმანისი
8121/90-G	23	9.7	1990	მღრღნელი	ქვემო ქართლი	დმანისი
8124/90-G	24	9.8	1990	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალქალაქი
8474/91-G	28	11.3	1991	ექტოპარაზიტი	ქვემო ქართლი	დმანისი
8531/91-G	31	11.4	1991	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
8740/92-G	32	11.5	1992	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ადიგენი
8912/97-G	38	11.6	1997	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალქალაქი
8913/97-G	39	11.7	1997	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
8976/97-G	43	11.8	1997	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	ქარელი
8979/97-G	46	13.5	1997	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	ქარელი
1469/02-G	48	13.1	2002	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
2026/02-G	52	11.1	2002	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ნინოწმინდა
4754/04-G	54	12.1	2004	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
4755/04-G	55	12.2	2004	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
4777/04-G	56	12.3	2004	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
4778/04-G	57	12.4	2004	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
4779/04-G	58	12.5	2004	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
4780/04-G	59	11.2	2004	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
4781/04-G	60	12.6	2004	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
4787/04-G	61	12.7	2004	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
4788/04-G	62	12.8	2004	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
4791/04-G	64	13.2	2004	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
4807/04-G	68	13.3	2004	ექტოპარაზიტი	შიდა ქართლი	გორი
4810/04-G	71	13.4	2004	ექტოპარაზიტი	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
6955/07-G	74	11.9	2007	წყალი	შიდა ქართლი	კასპი
6956/07-G	75	12.9	2007	წყალი	შიდა ქართლი	კასპი
6957/07-G	76	13.6	2007	წყალი	შიდა ქართლი	კასპი
6958/07-G	77	13.7	2007	წყალი	შიდა ქართლი	კასპი
LVS				ვაქცინა	დკვკმც	

მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი

რაოდენობის ანალიზი – MLVA

MLVA-25

დკსჯეც-ში MLVA-25 სისტემა თავდაპირველად 2007 წელს, გენეტიკური ანალიზატორის, CEQ-8000, Beckman Coulter, მიღების შემდეგ იყო გამოყენებული. ტიპირების მოცემულ სისტემაში *F. tularensis* 25 VNTR მარკერი შედიოდა (Johansson, A., 2004). გარდა ამისა, გამოყენებული იყო C1-C4 მარკერი (Johansson A., 2000; Farlow J., 2001), რომელიც *F. tularensis* B ტიპისათვის სპეციფიკური, 30-ნუკლეოტიდიანი დელეციის გამოვლენის საშუალებას იძლეოდა. C1-C4 მარკერი MLVA-25 სისტემის Ft-M19 ლოკუსს შეესაბამებოდა, თუმცა იგი შენარჩუნებული იყო კვლევაში განსხვავებული ფლუორესცენტული საღებავისა და პროდუქტის ზომის გამო (ცხრილი 8), რათა მოგვიანებით მულტიპლექსური ანალიზისათვის ყოფილიყო გამოყენებული. საკონტროლო შტამებად გამოყენებული იყო LVS (*F. tularensis holarctica*, B ტიპი) და SchuS4 (*F. tularensis tularensis*, A ტიპი) რეფერალური შტამების დნმ-ები.

VNTR ლოკუსის ვარიაბელობის დადგენა მიღებული ვარიანტების, ანუ ალელების რაოდენობის საფუძველზე ხდებოდა.

თავდაპირველად, დკსჯეც-ის ბაქტერიებისა და ვირუსების ეროვნული კოლექციიდან შერჩეული იყო *F. tularensis* 17 შტამი, რომლებიც ყველა 25 VNTR მარკერზე შემოწმდა. 25-დან სამმა მარკერმა (Ft-M3, Ft-M4, Ft-M6) გამოავლინა LVS და SchuS4 შტამებისაგან განსხვავებული MLVA პროფილი (ცხრილი 15).

კერძოდ, Ft-M6 მარკერზე ყველა ქართული შტამი იდენტური ზომის პროდუქტს აჩვენებდა (336 bp), რომელიც LVS და SchuS4 ალელებისაგან (315 bp) განსხვავდებოდა;

Ft-M4 მარკერი ქართულ შტამებს ორ ვარიანტად ჰყოფდა, რომელთაგან ერთერთი ალელის ზომა LVS ზომას ემთხვეოდა (445 bp), მეორე კი - SchuS4 (440 bp);

ყველაზე ვარიაბელური Ft-M3 მარკერის მიხედვით ქართულ შტამებს შორის რამოდენიმე ალელი გამოიკვეთა (328 bp, 337 bp და 346 bp), რომელთა ზომაც არ ჰგავდა არცერთი რეფერალური შტამის ალელს.

ცხრილი - 15. MLVA-25 ტიპირების შედეგების ცხრილი

Primer	VNTR ზომა, (nt)	VNTR რაოდენობა SchuS4-ში	Schu S4	LVS	4941-G/ 1	4947-G/ 2	4944-G/ 3	4807-G/ 68	6955-G/ 74	6956-G/ 75	6957-G/ 76	6958-G/ 77	7435-G/ 78	7436-G/ 79	7437-G/ 80	7573-G/ 81	7574-G/ 82	1935-G/ 8	8797-G/ 33	2024-G/ 50	8152-G/ 25	
Ft.M1	3	3	308	311	311	311	311	311	311	311	311	311	311	311	311	311	311	311	311	311	311	311
Ft.M2	6	4	461	453	453	453	453	453	453	453	453	453	453	453	453	453	453	453	453	453	453	453
Ft.M3	9	25	439	355	346	346	337	346	328	328	328	328	328	328	328	346	328	346	337	337	337	337
Ft.M4	5	3	440	445	445	445	445	445	440	440	440	440	440	440	440	445	440	445	445	445	445	445
Ft.M5	16	3	207	191	191	191	191	191	191	191	191	191	191	191	191	191	190	191	191	191	191	191
Ft.M6	21	4	315	315	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336	336
Ft.M7	16	4	207	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175
Ft.M8	16	4	285	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253	253
Ft.M9	16	4	246	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214	214
Ft.M10	16	18	646	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363	363
Ft.M11	10	5	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393	393
Ft.M12	10	2	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345	345
Ft.M13	12	2	325	313	313	313	313	313	313	313	313	313	313	313	313	313	313	313	313	313	313	313
Ft.M14	6	3	440	446	446	446	446	446	446	446	446	446	446	446	446	446	446	446	446	446	446	446
Ft.M15	6	2	221	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227
Ft.M16	10	2	221	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211	211
Ft.M17	6	3	350	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344
Ft.M18	6	4	372	362	362	362	362	362	362	362	362	362	362	362	362	362	362	362	362	362	362	362
Ft.M19	13	2	313	287	287	287	287	287	287	287	287	287	287	287	287	287	287	287	287	287	287	287
Ft.M20	12	3	256	268	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256
Ft.M21	7	3	405	398	398	398	398	398	397	398	398	398	398	398	398	398	398	398	398	398	398	398
Ft.M22	6	2	240	252	252	252	252	252	252	252	252	252	252	252	252	252	252	252	252	252	252	252
Ft.M23	23	2	435	412	412	412	412	412	412	412	412	412	412	412	412	412	412	412	412	412	412	412
Ft.M24	21	1	462	483	483	483	483	483	483	483	483	483	483	483	483	483	483	483	483	483	483	483
Ft.M25	2	5	152	156	156	155	156	156	156	156	156	156	156	156	156	156	156	156	156	156	156	156
Ft.C1-C4			177	147	147	147	147	147	147	147	147	147	147	147	147	147	147	147	147	147	147	147

C1-C4 და Ft-M19 მარკერებით მიღებული ალელების ზომის ანალიზით ყველა ქართული შტამი და LVS ერთნაირი ზომებით ხასიათდებოდნენ, ანუ ყველა მათგანი 30 ნუკლეოტიდით უფრო მცირე იყო, ვიდრე SchuS4 შტამის ალელი. ამით კიდევ ერთხელ დადასტურდა, რომ საქართველოში, ისევე როგორც მთელს ევროპაში, გავრცელებულია B ტიპის ტულარემიის გამომწვევი *F. tularensis* ქვესახეობა *holarctica* (Velijanashvili I. 1992).

ყველა დანარჩენი მარკერების მიხედვით SchuS4 განსხვავდებოდა როგორც ქართული, ისე LVS შტამებისაგან, რაც ჩვენი შტამების შიდა ვარიაბელობის შეფასებისას მხედველობაში მღებული არ ყოფილა.

მიღებული შედეგების საფუძველზე ვარიაბელური Ft-M3, Ft-M4, Ft-M6 და B ტიპის სპეციფიკური C1-C4 მარკერები გამოყენებული იყო ყველა დანარჩენი ქართული შტამის ტიპირებისათვის. შედეგად გამოვლინდა 8 MLVA პროფილი. მრავალფეროვნება ძირითადად ჰიპერვარიაბელური Ft-M3 მარკერით იყო გამოწვეული, რომელმაც 328 bp, 337 bp, 346 bp, 384 bp, 393 bp, 402 bp ზომის 6 განსხვავებული გენოტიპი გამოავლინა.

ამასთან უნდა აღინიშნოს, რომ 2012 წელს იზოლირებულ შტამებში Ft-M6 მარკერით განსხვავებული ალელიც გამოვლინდა, რომლის ზომაც SchuS4 და LVS შტამების ალელების ზომას (315 bp) ემთხვეოდა.

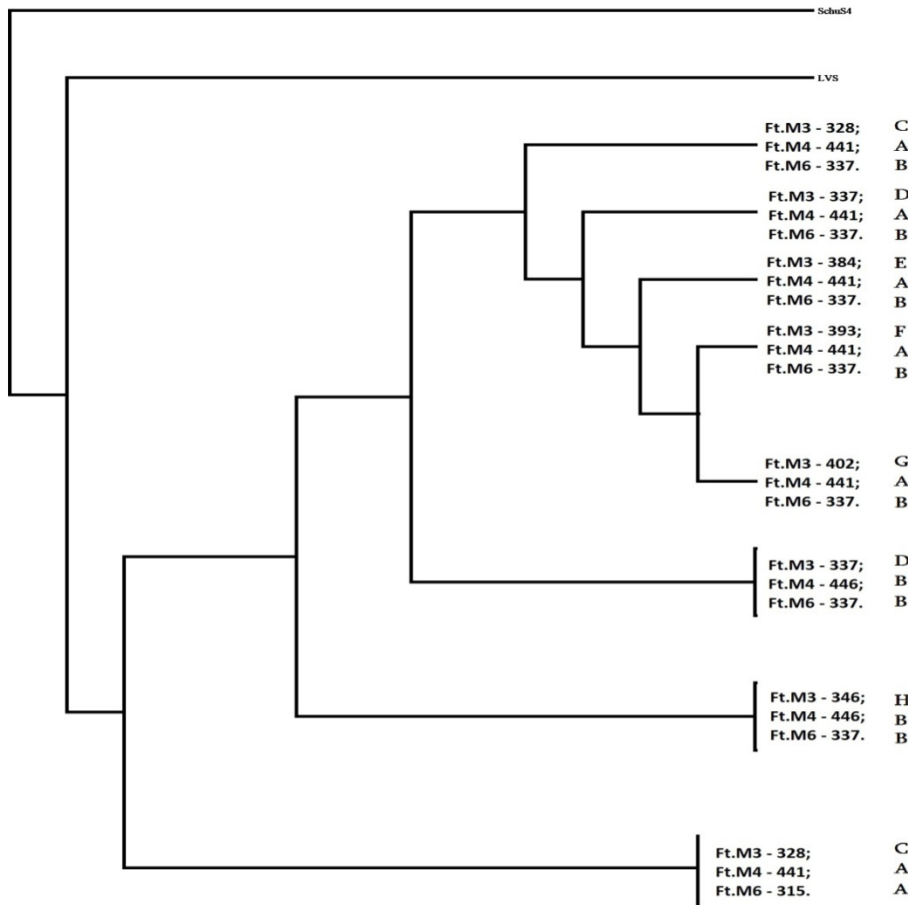
ქართული *F. tularensis* შტამების MLVA-25 ტიპირების შედეგები მოცემულია შემაჯამებელ ცხრილში SNP ტიპირების შედეგებთან ერთად (ცხრილი 19).

არსებული მონაცემების პირველადი დამუშავებისა და კომპიუტერული პროგრამების FreeTree და TreeView გამოყენებით აგებული იყო ფილოგენეტიკური ხე, რომელშიც რეფერალური შტამი SchuS4 გამოყენებული იყო როგორც ფილოგენეტიკური ფუძე.

დასკვნა:

1. ქართული შტამების MLVA-25 ტიპირების შედეგად მიღებულია SchuS4 და LVS შტამებისგან განსხვავებული 8 გენოტიპი;
2. ქართული შტამების შიგნით განსხვავება მხოლოდ სამმა MLVA მარკერმა მოგვცა: Ft-M3, Ft-M4, Ft-M6;

3. MLVA-25 ტიპირებით მიღებულ პირველად შედეგებზე დაყრდნობით, აგებულია პირველადი ფილოგენეტიკური ხე.



სურათი 29 . *F. tularensis* ქართული შტამების MLVA-25 ტიპირების შედეგად მიღებული ფილოგენეტიკური ხე. განშტოებების ბოლოში მოცემულია Ft.M3, Ft.M4 და Ft.M6 მარკერების ზომები და გენოტიპები.

მულტიპლექსური VNTR ანალიზის სისტემა

დკსჯევ კოლექციაში არსებული ქართული შტამების MLVA-25 სისტემით დახასიათების შემდეგ, მოხდა ყველაზე ვარიაბელური VNTR მარკერების ამორჩევა და მათი შესაბამისი პრაიმერების ერთ სარეაქციო სინჯარაში გაერთიანება. მიღებული მულტიპლექსურ ტესტით მოხდა სწრაფი გენოტიპირების მეთოდის შემუშავება, რომელიც უშუალოდ კლინიკურ და გარემო ნიმუშებზე იყო გამოყენებული. ამ მიზნით შეირჩეულ იქნა ყველაზე ვარიაბელური Ft-M3, Ft-M4 და B ტიპის ტულარემიისათვის

სპეციფიკური C1-C4 მარკერები. ყველა ამ მარკერს განსხვავებული ჰქონდათ ფლუორესცენტული საღებავი და მიღებული პროდუქტის ზომაც (ცხრილი 8, სურ. 23).

თავდაპირველად მულტიპლექსური მეთოდი გადამოწმებულ იქნა *F. tularensis* ყველა საკოლექციო შტამის დნმ ნიმუშებზე. მიღებული შედეგები და სამივე მარკერზე ცალცალკე დადგმული ცდების შედეგები ერთმანეთის იდენტური აღმოჩნდა.

ამის შემდგომ, ჩვენს მიერ შემუშავებული მულტიპლექსური MLVA სისტემა PCR დადებით კლინიკურ (ზუბონის შიგთავსი) და გარემო (ტკიპების ემულსიები) ნიმუშებზე გამოიყენა. მულტიპლექსური რეაქციის პირობები უცვლელი დარჩა, იმ განსხვავებით, რომ საკვლევი ნიმუშის დნმ გამოყენებული იყო საშუალოდ 5-ჯერ მეტი მოცულობით.

სულ ამ მეთოდით დახასიათებული იყო დკსჯეც კოლექციის 103 შტამი, PCR დადებითი 2 კლინიკური (ზუბონის შიგთავსი) და 13 გარემო (ექტოპარაზიტების ემულსია) ნიმუში და ამ გარემო ნიმუშებიდან ბიოცდისა და პირდაპირი გათესვის მეთოდებით მიღებული 13 პირველადი იზოლატი (ცხრილი 16).

ცხრილი - 16 . კლინიკური და გარემო ნიმუშების მულტიპლექსური MLVA ტიპირების შედეგები

ნიმუშის #	MLVA M3	MLVA M4	MLVA C1-C4	თვე / წელი	კლინიკური / გარემო ნიმუშის წყარო	ნიმუშის მოპოვების ადგილი
08E-NCDC / 02-06	384, 393	441	147	03/2008	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, Hm. otophila</i>	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC / 02-06/C	393	441	147	03/2008	იზოლატი, ტკიპების ემულსია #06	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC / 02-/B06/C	337	446	147	03/2008	იზოლატი, ბიოცდა #06,(ტკ. ემ. #06)	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC / 02-07	384, 393	441	147	03/2008	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, Hm. otophila</i>	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC / 02-12	393	441	147	03/2008	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, Hm. otophila</i>	კასპი, ს. ლამისყანა
08E-NCDC / 02-/B10/C	337	446	147	03/2008	იზოლატი, ბიოცდა #10 (ტკ. ემ. #12)	კასპი, ს. ლამისყანა
07H / 02-02	328	441	147	01/2007	კლინიკური, ზუბონის პუნქტატი	კასპი, ს. ზემო რენე
07H / 02-23	328	441	147	01/2007	კლინიკური, ზუბონის პუნქტატი	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC / 78	393	441	147	05/2008	ტკიპების ემულსია	კასპი, ს. ზემო რენე
08E-NCDC / 85	402	441	147	05/2008	ტკიპების ემულსია	კასპი, ს. ზემო რენე
08H / 02-58	337	446	147	09/2008	კლინიკური, ზუბონის პუნქტატი	საგარეჯო, ს. წყაროსთავი
11E-NCDC / 02-83	402	441	147	03/2011	ტკიპების ემულსია, <i>Hm. otophila</i>	გორი, ს. ნადარბაზევი
11E-NCDC / 02-90	402	441	147	03/2011	ტკიპების ემულსია, <i>D. marginatus</i>	ცხინვალი, ს. ნოქოზა
11E-NCDC / 02-117	328	441	147	03/2011	ტკიპების ემულსია, <i>D. marginatus</i>	კასპი, ს. იგოეთი
11E-NCDC / 02-/B10/C	402	441	147	03/2011	იზოლატი, ბიოცდა #10 (ტკ. ემ. #82-89)	გორი, ს. ნადარბაზევი
11E-NCDC / 02-/B14/C	328	441	147	03/2011	იზოლატი, ბიოცდა #14 (ტკ. ემ. #108-120)	კასპი, ს. იგოეთი
11E-NCDC / 02-83/C	402	441	147	03/2011	იზოლატი, ტკიპების ემულსია #83	გორი, ს. ნადარბაზევი
11E-NCDC / 02-90/C	402	441	147	03/2011	იზოლატი, ტკიპების ემულსია #90	ცხინვალი, ს. ნოქოზა

11E-NCDC/ /02-117/C	328	441	147	03/2011	იზოლატი, ტკიპების ემულსია #117	კასპი, ს. იგოეთი
12E-NCDC/ /02-31	328	441	147	05/2012	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, D. marginatus</i>	კასპი, ს. ზემო რენე
12E-NCDC/ /02-68	328	441	147	05/2012	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, D. marginatus</i>	კასპი, ს. ქვემო ჭალა
12E-NCDC/ /02-69	328	441	147	05/2012	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, H. sulcata</i>	კასპი, ს. ქვემო ჭალა
12E-NCDC/ /02-74	328	441	147	05/2012	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, H. punctata</i>	კასპი, ს. ოკამი
12E-NCDC/ /02-92	393	441	147	05/2012	ტკიპების ემულსია, <i>Ixodae, D. marginatus</i>	გორი, ს. ტყვიავი
12E-NCDC/ /02-31/C	328	441	147	05/2012	იზოლატი, ტკიპების ემულსია #31	კასპი, ს. ზემო რენე
12E-NCDC/ /02-68/C	328	441	147	05/2012	იზოლატი, ტკიპების ემულსია #68	კასპი, ს. ქვემო ჭალა
12E-NCDC/ /02-69/C	328	441	147	05/2012	იზოლატი, ტკიპების ემულსია #69	კასპი, ს. ქვემო ჭალა
12E-NCDC/ /02-74/C	328	441	147	05/2012	იზოლატი, ტკიპების ემულსია #74	კასპი, ს. ოკამი
12E-NCDC/ /02-92/C	393	441	147	05/2012	იზოლატი, ტკიპების ემულსია #92	გორი, ს. ტყვიავი

ტკიპების ემულსიის ერთერთი ნიმუშის (08E-NCDC//02-06) და ამ ნიმუშიდან უშუალო გათესვით მიღებული პირველადი ნათესის ანალიზით ერთდროულად გამოვლინდა ორი MLVA გენოტიპი, რომელთა ზომები Ft-M3 მარკერის ერთი VNTR თანმიმდევრობით განასხვავდებოდნენ (384 bp და 393 bp). გადამოწმების შემდეგ პასუხი არ შეცვლილა, რაც იმას მოწმობს, რომ ტკიპების ემულსიაში თავიდანვე შერეული გენოტიპების მქონე შტამები იყო. ამ ნიმუშიდან ბიოცდით მიღებული *F. tularensis* იზოლატის MLVA ანალიზის შედეგად გამოვლინდა მხოლოდ ერთერთი MLVA გენოტიპი (393 bp).

შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ტკიპების ემულსიაში ერთდროულად ორი სხვადასხვა შტამით ინფიცირებული ეგზემპლარი ან ეგზემპლარები მოხვდა. თუმცა ისიც შესაძლებელია, რომ ტკიპის ინფიცირების შემდეგ *F. tularensis* შტამმა გამრავლების პროცესში ჰიპერვარიანებულ Ft-M3 მარკერზე მუტაცია განიცადა. ნებისმიერ შემთხვევაში მიღებული შედეგი შესაძლებელია ეპიდემიოლოგიური თვალსაზრისით ძალიან ინფორმატიული აღმოჩნდეს ამა თუ იმ სიტუაციაში ინფიცირების გზების დადგენის პროცესში.

დასკვნა:

1. ქართული *F. tularensis* შტამების მულტიპლექსური ანალიზის პასუხები სამივე მარკერზე ცალცალკე მიღებული შედეგების იდენტური აღმოჩნდა.

2. MLVA ტიპირების გამოყენება შესაძლებელია უშუალოდ გარემო და კლინიკურ ნიმუშებზე.

3. ერთ ნაკრებ გარემო ნიმუშში შესაძლებელია განსხვავებული MLVA გენოტიპის მქონე შერეული შტამების აღმოჩენა.

MLVA-11

ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტში გაგზავნილი 25 ქართული *F. tularensis* შტამის უკეთ შესწავლის მიზნით VNTR ტიპირება ჩატარდა ახალი, მოდიფიცირებული MLVA-11 სისტემით (Vogler et al. 2009a). გამოვლინდა 5 გენოტიპი, რომლებიც NAU მონაცემთა ბაზასთან შედარების შედეგად ქართული შტამებისათვის უნიკალური აღმოჩნდა. თუმცა მიღებული გენოტიპები იმავე სტრუქტურის დაცვით გადანაწილდა, როგორც MLVA-25 ტიპირების შედეგად იყო მიღებული, ხოლო მრავალფეროვნება იმავე Ft-M3 და Ft-M4 მარკერების ხარჯზე გამოვლინდა (ცხრილი 17).

დასკვნა:

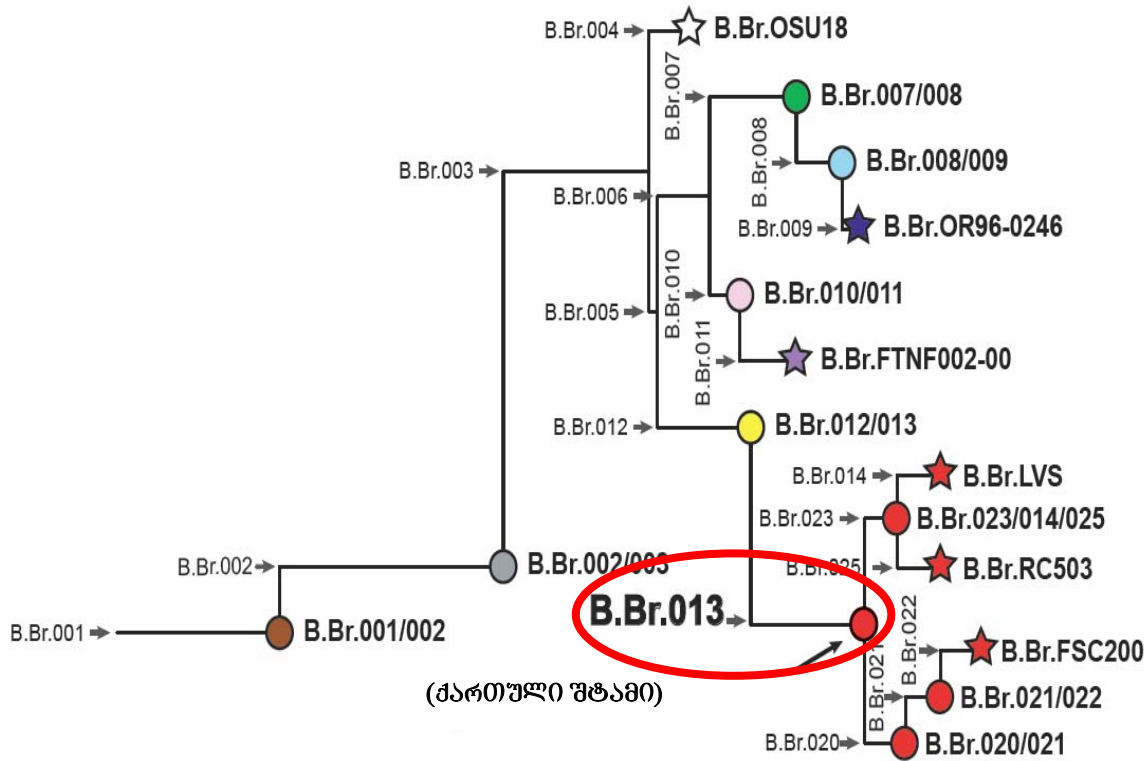
ქართული შტამების მოდიფიცირებული MLVA-11 სისტემით ტიპირებამ არ გამოავლინა ახალი გენოტიპები, რის შედეგადაც მოიხსნა დკსჯეც კოლექციაში არსებული ყველა ქართული შტამის ხელახალი MLVA ტიპირების აუცილებლობა.

ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი - SNP

F. tularensis შტამების ტიპირება ერთი ნუკლეოტიდის მეორეთი ჩანაცვლებაზე დაყრდნობით, ანუ ე.წ. ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის (SNP) ტიპირება რამოდენიმე ეტაპად ჩატარდა.

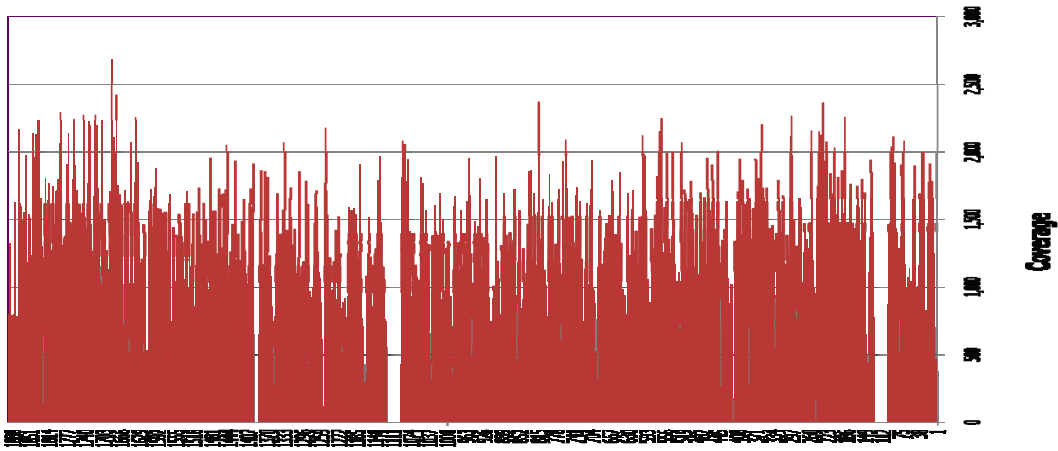
თავდაპირველად, ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტში გადაგზავნილი 25 ქართული *F. tularensis* დნმ ნიმუშები MLVA-11 მარკერებთან ერთად შემოწმდა მათ მიერვე შემუშავებულ ე.წ. კანონიკურ SNP (canSNP) მარკერებზე (Vogler et al. 2009b, Vogler et al. 2009a). კერძოდ, melt-MAMA მეთოდის გამოყენებით დაიდგა *F. tularensis* B.Br.001, B.Br.002, B.Br.003, B.Br.004, B.Br.005, B.Br.006, B.Br.012 და B.Br.013 განშტოებების სპეციფიკური ტესტები.

ტიპირების შედეგად ყველა 25 ქართული შტამი მოხვდა B.Br.013/014 ქვეჯგუფში, რომელშიც ძირითადად აღმოსავლეთ და ცენტრალური ევროპის, მათ შორის LVS შტამებია განთავსებული (Vogler et al. 2009b; Gyuranecz M., et al. 2012a).



სურათი 30. *F. tularensis* ქართული შტამები განთავსდა B.Br.013/014 ფილოგენეტიკურ SNP ქვეჯგუფში (Vogler et al. 2009b)

ქართული შტამებისათვის სპეციფიკური SNP ლოკუსების აღმოჩენის მიზნით დკსჯეც-ის ეროვნულ კოლექციაში არსებული ქართული *F. tularensis* შტამებიდან ერთერთი ყველაზე გავრცელებული MLVA პროფილის მქონე შტამი (NAU ID_F0673) შეირჩა სრული გენომის სექვენირებისათვის (WGS). გენომის სექვენირება ჩატარდა ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტში (NAU) მოკლე ფრაგმენტების წაკითხვის ტექნოლოგიით, Illumina's Genome Analyzer II (San Diego, CA) სისტემის გამოყენებით. მიღებული იყო გადაფარვის ძალიან მაღალი მაჩვენებელი (საშუალოდ 1.076X). შესაბამისი დამუშავების შემდეგ გენომური თანმიმდევრობა გადაეცა გენომური ბანკის (GenBank) მონაცემთა ბაზას ნომრით SRP003002.2.



სურათი 31. *F. tularensis* ქართული შტამის F0673 დნმ-ის მოკლე თანმიმდევრობების გადაფარვის დიაგრამა შედარებული LVS გენომთან.

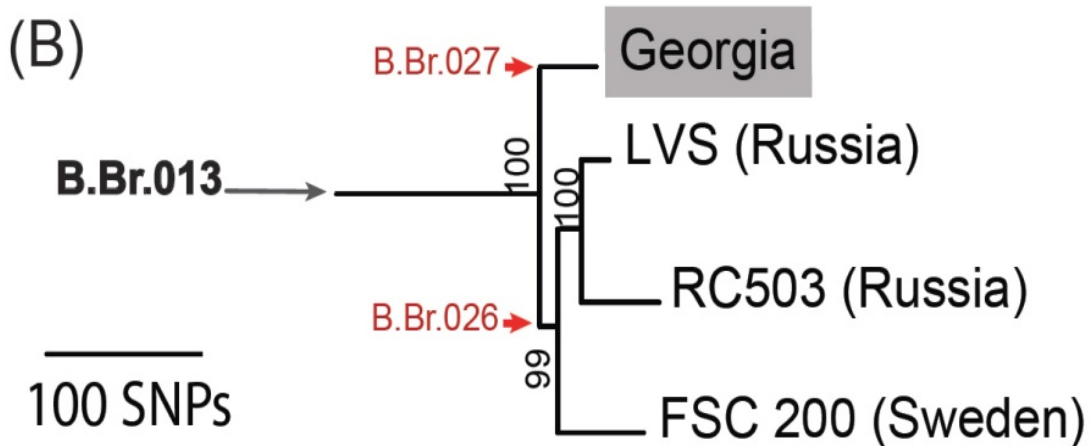
სავარაუდო SNP ლოკუსების მოძიების მიზნით, მოხდა ქართული *F. tularensis* შტამის გენომური თანმიმდევრობის შედარება მონაცემთა ბაზაში არსებული ოთხი შტამის სრულ გენომურ თანმიმდევრობასთან (GenBank – *F. tularensis holarctica* FSC200 NZ_AASP00000000, *F. tularensis holarctica* LVS NC_007880, *F. tularensis* subsp. *holarctica* OSU18 NC_008369; Human Genome Sequencing Center at Baylor College of Medicine – *F. tularensis holarctica* RC503). აქედან სამი შტამი (FSC200, LVS, RC503) იმავე B.Br.013 ქვეჯგუფს ეკუთვნოდა, რომელშიც კანონიკური SNP ტიპირების შედეგად ქართული შტამები მოთავსდნენ. OSU18 შტამი შერჩეული იყო, როგორც გარე განშტოების წარმომადგენელი (B.Br.004). ხოლო *F. tularensis tularensis* SCHU-S4 (NC_006570) გამოყენებული იყო SNP პოზიციების განსაზღვრისათვის, როგორც საკონტროლო - რეფერალური შტამი.

გენომების შედარების შედეგად გამოვლენილი ათასობით SNP-დან შემდგომი კვლევებისათვის გამოსადეგი ლოკუსების ამორჩევისას გათვალისწინებული იყო შემდეგი კრიტერიუმები:

1. მოცემული SNP ლოკუსი ყველა სექვენირებული შტამის თანმიმდევრობაში უნდა ყოფილიყო წარმოდგენილი;
2. SNP არ უნდა ყოფილიყო განმეორებად უბნებში;
3. სამი განსხვავებული ნუკლეოტიდური ვარიანტის SNP ამოღებული უნდა ყოფილიყო ანალიზიდან;

4. მოცემულ SNP პოზიციასთან 11 ნუკლეოტიდზე ახლოს არ უნდა ყოფილიყო მეორე SNP.

სრული გენომების შედარების შედეგად მიღებული მონაცემების საფუძველზე კომპიუტერული პროგრამის PAUP 4.0b10 (D. Swofford, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA) გამოყენებით აგებული იყო ფილოგენეტიკური ხე, რომელზედაც სხვა შტამებთან შედარებით ქართულმა შტამმა ბაზალური მდებარეობა დაიკავა.



სურათი 32. *F. tularensis* ქართული (F0673) შტამისა და სხვა სრული გენომური თანმიმდევრობების შედეგად აგებული ფილოგენეტიკური ხე

კერძოდ, სექვენირებული ქართული შტამის გენომური თანმიმდევრობის B.Br.013 ქვეჯგუფში შემავალ სამ სხვა გენომურ თანმიმდევრობასთან (FSC200, LVS, RC503) შედარებით დადგინდა:

- ✓ აქამდე აღწერილი B.Br.013 ქვეჯგუფი და ახალი აღმოჩენილი ქართული (B.Br.027) განშტოება საერთო წინაპარისაგანაა წარმოქმნილი;
- ✓ B.Br.013 ქვეჯგუფი გაიყო ორად - ამ ქვეჯგუფში ადრე შემავალი შტამებისა (B.Br.026) და ქართული შტამის (B.Br.027) განშტოება;
- ✓ B.Br.013 ქვეჯგუფის დანარჩენ წევრებთან (B.Br.026) შედარებით ქართულმა განშტოებამ (B.Br.027) ბაზალური პოზიცია დაიკავა;

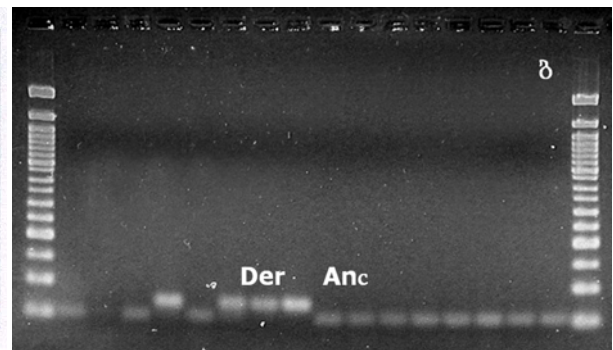
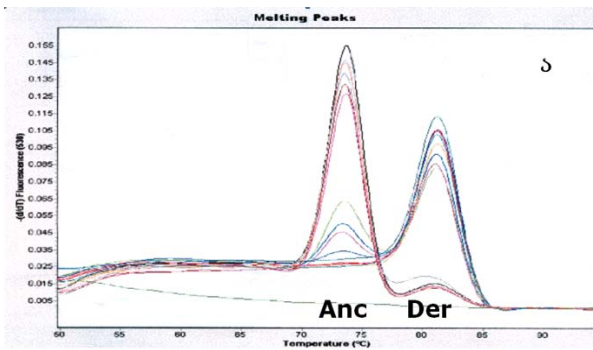
- ✓ ქართული შტამი დანარჩენ ქვეჯგუფებს 45 სავარაუდო SNP-ით გამოეყო, რომელთაგან 39 SNP უშუალოდ ქართული განშტოებისათვის იყო სპეციფიკური, ხოლო 6 - B.Br.026 ქვეჯგუფში შემავალი შტამებისათვის.

ქართული ქვეჯგუფისათვის სპეციფიკური 39 SNP ლოკუსებიდან შემუშავდა *F. tularensis* ქვესახეობა *holarctica* გენოტიპირების 21 melt-MAMA (Mismatch Amplification Mutation Assay) SNP ტესტი, რომლებიც დიზაინირებული იყო, როგორც SYBR-Green ფლუორესცენტული საღებავის შემცველი რეალური დროის PCR, ასევე გელ-ელექტროფორეზით მიმდინარე კლასიკური PCR ანალიზისათვის. უკვე შემუშავებული და ვალიდირებული 21 SNP ტესტის პანელი გამოყენებულ იქნა B.Br.013/014 ქვეჯგუფში დამატებითი ფილოგენეტიკური სტრუქტურის გამოვლენისათვის. ამისათვის პირველ რიგში გადამოწმდა 25 ქართული, ხოლო შემდეგ NAU კოლექციაში არსებული *F. tularensis* 132 შტამი, რომლებიც სხვადასხვა გეოგრაფიულ არეალში იყვნენ იზოლირებულები. მოგვიანებით ამავე ტესტების გამოყენებით დახასიათდა დკსჯეც კოლექციაში არსებული *F. tularensis* 103 შტამი.

შემდგომ ეტაპზე იმ SNP ლოკუსებიდან, რომლებიც ერთსა და იმავე ქვეჯგუფებს აღწერდნენ მოხდა თითო ქართული განშტოებისათვის სპეციფიკური კანონიკური SNP მარკერის ამორჩევა, რის შედეგადაც შემცირდა დასადგმელი რეაქციების რაოდენობა. კანონიკური პრაიმერების შერჩევა Melt-MAMA რეაქციებისათვის ლლობის მრუდების ხარისხის გათვალისწინებით ხდებოდა. კერძოდ, შეცვლილი და პირველადი SNP ვარიანტების ამპლიკონების ლლობის ტემპერატურული პიკები ერთმანეთისაგან საგრძნობლად უნდა ყოფილიყვნენ დაშორებულები, ანუ ლლობის ტემპერატურებში სხვაობა რამოდენიმე °C უნდა ყოფილიყო. ამასთან, სასურველი იყო პიკებს მკვეთრი, ერთმუხლიანი ფორმა ჰქონოდათ. გელ-ელექტროფორეზისათვის გათვალისწინებული პრაიმერების შერჩევისას გათვალისწინებული იყო ამპლიფიცირებული პროდუქტის რაოდენობა და სიმკვეთრე.

ცხრილი - 17. NAU-ში ჩატარებული SNP ტიპირების შედეგების ცხრილი. F0655-F0679 ქართული *F. tularensis* შტამები (NAU); LVS, *F. novicida*, F0400, F0420 გარე განშტოებების შტამები; SNP ნუკლეოტიდი (შეცვლილი/პირველადი); პრაიმერების ნომრები SCHU-S4 რეფერალური შტამის (NC_006570) გენომში შესაბამისი SNP პოზიციების მიხედვით; MLVA-11 სისტემის ვარიანტული Ft-M3 და Ft-M4 მარკერების ზომები.

პრაიმერი, პოზიცია	1438243	1329755	1820141	934015	480003	855899	1802073	166256	1872800	1422276	212729	492386	1368981	483327	1185521	906676	855041	1596420	928336	1634600	283541	MLVA ალელი, Ft-M03	MLVA ალელი, Ft-M04
ნომრის # (NAU)	SNP (T/G)	SNP (T/G)	SNP (A/G)	SNP (G/T)	SNP (G/A)	SNP (A/G)	SNP (T/C)	SNP (A/G)	SNP (A/G)	SNP (A/C)	SNP (T/G)	SNP (A/C)	SNP (T/C)	SNP (T/G)	SNP (A/G)	SNP (T/C)	SNP (T/C)	SNP (T/G)	SNP (T/G)	SNP (A/G)	SNP (A/G)		
F0677	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	G	C	C	G	G	C	C	G	G	G	G	B	B
F0658	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	C	G	G	C	C	G	G	G	G	A	A
F0660	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	C	G	G	C	C	G	G	G	G	D	A
F0662	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	C	G	G	C	C	G	G	G	G	A	A
F0674	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	C	G	G	C	C	G	G	G	G	A	A
F0675	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	C	G	G	C	C	G	G	G	G	A	A
F0678	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	C	G	G	C	C	G	G	G	G	D	A
F0679	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	C	G	G	C	C	G	G	G	G	E	A
F0659	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	G	G	G	B	B
F0665	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	G	G	G	B	B
F0666	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	G	G	G	B	B
F0667	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	G	G	G	B	B
F0668	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	G	G	G	B	B
F0669	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	G	G	G	B	B
F0670	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	G	G	G	B	B
F0672	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	T	G	G	C	B
F0655	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	T	A	G	C	B
F0656	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	T	A	A	C	B
F0657	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	T	A	A	C	B
F0661	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	T	A	A	C	B
F0663	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	T	A	A	C	B
F0664	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	T	A	A	C	B
F0671	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	T	A	A	C	B
F0673	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	T	A	A	C	B
F0676	T	T	A	G	G	A	T	A	A	A	T	A	T	T	A	T	T	T	T	A	A	C	B
F.nov.	G	G	G	T	A	G	C	G	G	C	G	C	C	G	G	C	C	G	G	G	G		
F0400	G	G	G	T	A	G	C	G	G	C	G	C	C	G	G	C	C	G	G	G	G		
F0420	G	G	G	T	A	G	C	G	G	C	G	C	C	G	G	C	C	G	G	G	G		
LVS	G	G	G	T	A	G	C	G	G	C	G	C	C	G	G	C	C	G	G	G	G		

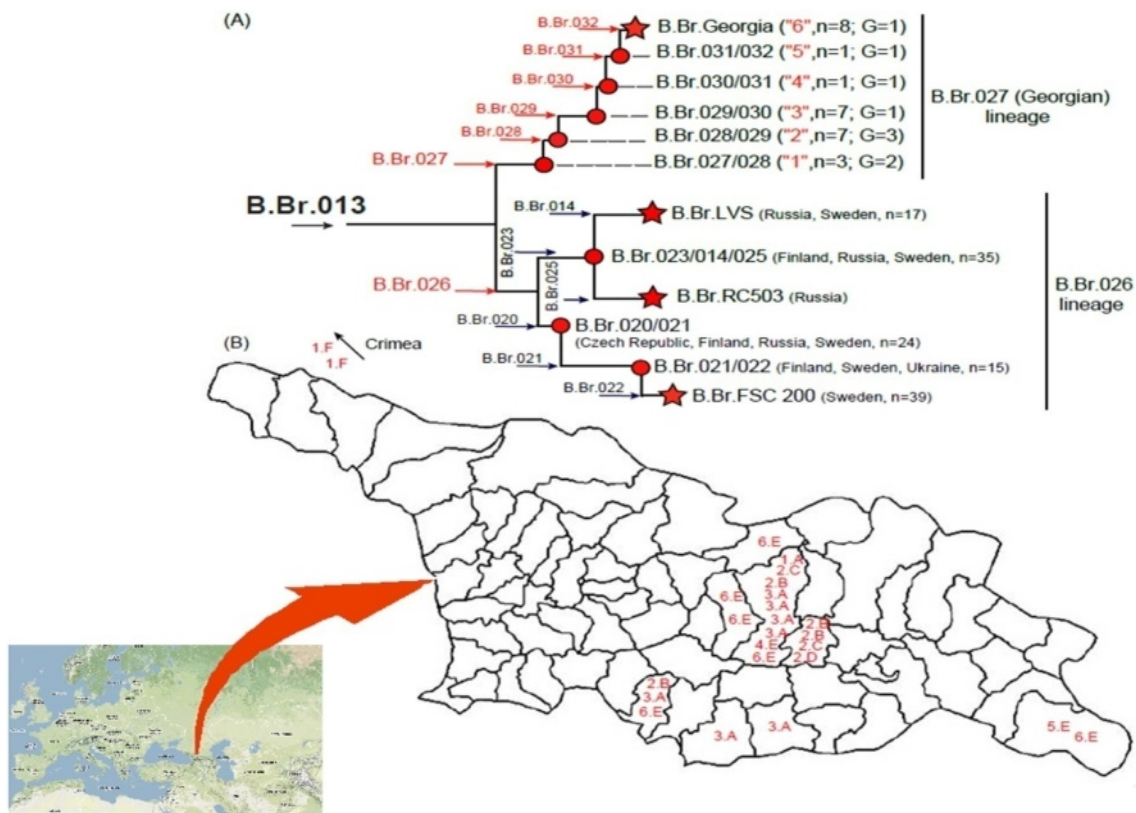


სურათი 33. SNP ანალიზის შედეგები: ა) ლღობის მრუდები და ბ) გელ-ელექტროფორეზი.

(Anc) – პირველადი და (Der) – შეცვლილი SNP;

საბოლოო ჯამში, B.Br.027 სწორხაზოვან განშტოებაში გამოიკვეთა 6 ახალი, მონომორფული ქვეჯგუფი (B.Br.027 - B.Br.032) (სურ. 34), რომლებშიც უპირატესად ქართული იზოლატები იყვნენ გადანაწილებულები. გამონაკლისი მხოლოდ უკრაინის, კერძოდ კი ყირიმის ორი შტამი აღმოჩნდა, რომლებიც ერთადერთ ქართულ შტამთან ერთად (შტამი #8898/08-G, დნმ #85) ფილოგენეტიკურად ყველაზე ძველ B.Br.027 ქვეჯგუფში განთავსდნენ. NAU კოლექციაში არსებული ყველა დანარჩენი ევროპული შტამი მანამდე აღწერილ B.Br.026 ქვეჯგუფში გადანაწილდა.

საქართველოში იზოლირებული *F. tularensis* 25 შტამის SNP ქვეჯგუფების შიგნით დამატებითი გენეტიკური მრავალფეროვნების გამოსავლენად გამოყენებული იყო MLVA-11 სისტემით (Vogler et al. 2009a) ტიპირების შედეგები. აღმოჩნდა, რომ ზოგიერთი MLVA გენოტიპი რამოდენიმე SNP ქვეჯგუფშია გადანაწილებული და პირიქით, ზოგი SNP ქვეჯგუფი რამოდენიმე MLVA გენოტიპითაა წარმოდგენილი. კერძოდ, ყველაზე ბაზალური ქართული SNP ჯგუფში (B.Br.027/028) შემავალი ერთი ქართული იზოლატი წარმოდგენილი იყო MLVA გენოტიპით, რომელიც იმავე ქვეჯგუფში შემავალი ყირიმის შტამებისაგან მცირედ განსხვავდებოდა. B.Br.028/029 ქვეჯგუფში შვიდმა ქართულმა იზოლატმა 3 MLVA გენოტიპი მოგვცა. ქვეჯგუფი B.Br.029/030 (7 შტამი) ერთი MLVA გენოტიპით იყო წარმოდგენილი, ხოლო B.Br.030/031 (1 შტამი), B.Br.031/032 (1 შტამი) და ტერმინალურ B.Br.032 ქვეჯგუფებს (8 შტამი) საერთო MLVA პროფილი აღმოაჩნდათ.



სურათი 34. *F. tularensis* ქართულ შტამებს შორის გამოვლინდა ექვსი ქვეჯგუფი: B.Br.027 - B.Br.032. ფრჩხილებში მოცემულია G - MLVA გენოტიპები და N - იზოლატების რაოდენობა.

შემდგომ ეტაპზე ქართული ქვეჯგუფისათვის სპეციფიკური 21 SNP ტესტის გამოყენებით მოხდა დკსჯეც კოლექციაში არსებული *F. tularensis* ყველა შტამის გამოკვლევა (ცხრილი 19).

იმავე სტრუქტურული კომბინაციით, რაც NAU-ში 25 შტამის ტიპირების შედეგად მივიღეთ, *F. tularensis* ქართული შტამების უმეტესობა გადანაწილდა B.Br.028 (32 შტამი), B.Br.029 (35 შტამი) და B.Br.032 (29 შტამი) ქვეჯგუფებში (ცხრილი 19), ხოლო B.Br.027 ქვეჯგუფში ისევ ის ერთი შტამი (8898/08-G) მოხვდა, რომელიც გორის რაიონის სოფ. ლამისყანაში იყო გამოყოფილი.

SNP და MLVA შედეგების შეჯამებით ყველაზე მრავალფეროვანი კვლავ B.Br.028 გამოვიდა იმ განსხვავებით, რომ ამჯერად MLVA გენოტიპების რაოდენობა გაიზარდა - ორის ნაცვლად სამი ვარიანტული MLVA მარკერის (Ft-M3, Ft-M4, Ft-M6) კომბინაციით მივიღეთ 6 MLVA გენოტიპი (ცხრილი 18).

ცხრილი - 18. დსკჯეც კოლექციის *F. tularensis* 103 შტამის SNP და MLVA შედეგების შემაჯამებელი ცხრილი

SNP ქვეჯგუფი	MLVA გენოტიპი Ft-M3	MLVA გენოტიპი Ft-M4	MLVA გენოტიპი Ft-M6	MLVA გენოტიპების კომბინაცია	გენოტიპების რაოდ. SNP ქვეჯგუფში	შტამების რაოდ. SNP ქვეჯგუფში
Ft.A.I.Br.002	A	A	A	AAA	1	SchuS4
Ft.B.Br.014	B	B	A	BBA	1	LVS
Ft.B.Br.027	D	B	B	DBB	1	1
Ft.B.Br.028	C, D, E, F, G	A	A, B	CAA, CAB, DAB, EAB, FAB, GAB	6	33
Ft.B.Br.029	D	B	B	DBB	1	35
Ft.B.Br.030	H	B	B	HBB	1	3
Ft.B.Br.031	H	B	B	HBB	1	8
Ft.B.Br.032	H	B	B	HBB	1	23

ორი ახალი MLVA გენოტიპი ბოლო სამი წლის განმავლობაში შიდა ქართლის ბუნებრივ კერაში იზოლირებულ შტამებში გამოვლინდა (ცხრილი 19). მანამდე იზოლირებულ შტამებში SNP და MLVA გენოტიპების გადანაწილების სურათი შემდეგნაირი იყო:

- Ft.B.Br.028 ქვეჯგუფის შტამებში 440-ნუკლეოტიდიანი ზომის Ft-M4 VNTR მარკერი მკაცრად კორელირებდა Ft-M3 მარკერის 328, 384, 393 და 402 და Ft-M6 მარკერის 337-ნუკლეოტიდიან ზომებთან (CAB, EAB, FAB, GAB გენოტიპები);
- Ft.B.Br.029 ქვეჯგუფში განთავსებულ შტამებში Ft-M3 მარკერი მხოლოდ 337-ნუკლეოტიდიანი ზომის პროდუქტით გვხვდებოდა, რომელიც თავის მხრივ მკაცრად შეესაბამებოდა Ft-M4 მარკერის 445-ნუკლეოტიდიან და Ft-M6 მარკერის 337-ნუკლეოტიდიან ზომებს (DBB გენოტიპი);
- ხოლო 446-ნუკლეოტიდიანი Ft-M3 მარკერი, რომელიც კვლავ მკაცრად კორელირებდა 445-ნუკლეოტიდიან Ft-M4 მარკერთან და 337-ნუკლეოტიდიან Ft-M6 მარკერთან, ბოლო სამი SNP ქვეჯგუფს Ft.B.Br.030 – Ft.B.Br.032 იკავებდა (HBB გენოტიპი).

ანუ, აქამდე ტიპირებული ქართული შტამების შიდა გადანაწილებაში ე.წ. ჰომოპლაზიას ადგილი პრაქტიკულად არ ჰქონია და SNP და MLVA შედეგები თითქმის ერთსა და იმავე დატვირთვას ატარებდა შტამების პასპორტიზაციაში, რაც ზოგადად იშვიათი მოვლენაა. ჩვეულებრივ SNP ტიპირება შტამების ფილოგენეტიკურ გადანაწილებას ახდენს, ხოლო MLVA - ქვეჯგუფების შიგნით დიფერენცირებას.

ახალი შტამების იზოლირებასთან ერთად მოიმატა ჰომოპლაზიის ხარისხმაც. კერძოდ, Ft-M6 VNTR მარკერი, რომელიც ყველა ქართული შტამისათვის ერთსა და იმავე ზომის გენოტიპს გვაძლევდა, SchuS4 და LVS შტამების მსგავსი გენოტიპით გამოვლინდა (CAA გენოტიპი); ხოლო Ft-M3 მარკერის 337-ნუკლეოტიდიანი ზომა, რომელიც სტაბილურად 445-ნუკლეოტიდიან Ft-M4 მარკერს შეესაბამებოდა და ძირითადად Ft.B.Br.029 ქვეჯგუფში გვხვდებოდა, ახალი კომბინაციით წარმოგვიდგა Ft.B.Br.028 ქვეჯგუფში (DAB გენოტიპი).

დასკვნა:

ქართული შტამების SNP ტიპირების შედეგად გამოიკვეთა 6 ქვეჯგუფი, რომლებიც გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხეზე გადანაწილდა მონომორფულ B.Br.027 - B.Br.032 განშტოებებში;

ფილოგენეტიკურად ყველაზე ძველ Ft.B.Br.027 განშტოებაში მხოლოდ ერთი ქართული და ორი უკრაინული, ყირიმის შტამი მოხვდა;

MLVA გენოტიპებით ყველაზე მრავალფეროვანი Ft.B.Br.028 ქვეჯგუფი გამოდგა, სადაც ორი ახალი MLVA გენოტიპიც შევიდა;

ფილოგენეტიკურად შედარებით ახალ SNP ქვეჯგუფებს საერთო MLVA გენოტიპი ჰქონდათ.

ცხრილი - 19. დესჯეც-ის კოლექციაში არსებული ყველა შტამის SNP და MLVA ტიპირების შედეგები.

შტამის #	დნმ #	MLVA C1-C4	MLVA -M3	MLVA -M4	MLVA -M6	SNP Br	იზოლაგის წელი	შტამის იზოლაგის წყარო	კერა	რაიონი
4941/56-G	1	147	346	446	337	Ft.B.Br.031	1956	მღრღნელი	კახეთი	დედოფლისწყარო
4947/56-G	2	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1956	იქსოდური ტკიპა	კახეთი	დედოფლისწყარო
4944/74-G	3	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1974	ბიგა	შიდა ქართლი	ცხინვალი
867/77-G	4	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1977	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ადიგენი
932/77-G	5	147	346	446	337	Ft.B.Br.031	1977	ფრინველების ამონანთხევი	სამცხე-ჯავახეთი	ადიგენი
1263/78-G	6	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1978	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
1803/80-G	7	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1980	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
1935/80-G	8	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1980	წყაროს წყალი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
1940/80-G	9	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1980	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
1996/80-G	10	147	346	446	337	Ft.B.Br.030	1980	მღრღნელი	შიდა ქართლი	ხაშური
1998/80-G	11	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1980	რწყილი	შიდა ქართლი	გორი
2068/81-G	12	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1981	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
2683/82-G	13	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1982	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
2799/82-G	14	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1982	მღრღნელი	შიდა ქართლი	გორი
2800/82-G	15	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1982	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
2816/82-G	16	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1982	მღრღნელი	შიდა ქართლი	გორი
2827/82-G	17	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1982	წყალი	შიდა ქართლი	გორი
2828/82-G	18	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1982	მღრღნელი	შიდა ქართლი	გორი
6141/86-G	19	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	1986	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
6176/86-G	20	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1986	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
7149/87-G	21	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1987	გამაზისებური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
8120/90-G	22	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1990	მღრღნელი	ქვემო ქართლი	დმანისი
8121/90-G	23	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1990	მღრღნელი	ქვემო ქართლი	დმანისი
8124/90-G	24	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1990	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ახალქალაქი
8152/90-G	25	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1990	მღრღნელი	ქვემო ქართლი	დმანისი
8153/90-G	26	147	346	446	337	Ft.B.Br.030	1990	მღრღნელი	ქვემო ქართლი	დმანისი
8226/90-G	27	147	346	446	337	Ft.B.Br.031	1990	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
8474/91-G	28	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1991	გამაზისებური ტკიპა	ქვემო ქართლი	დმანისი
8515/91-G	29	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1991	მღრღნელი	ქვემო ქართლი	დმანისი
8524/91-G	30	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1991	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
8531/91-G	31	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1991	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
8740/92-G	32	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1992	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ადიგენი
8797/92-G	33	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1992	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
8798/92-G	34	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1992	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე

8909/97-G	35	147	346	446	337	Ft.B.Br.031	1997	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ახალქალაქი
8910/97-G	36	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1997	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალქალაქი
8911/97-G	37	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1997	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალქალაქი
8912/97-G	38	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1997	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ახალქალაქი
8913/97-G	39	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	1997	რწყილი	სამცხე-ჯავახეთი	ახალციხე
8916/97-G	40	147	346	446	337	Ft.B.Br.031	1997	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
8917/97-G	41	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1997	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
8975/97-G	42	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1997	ხორბალი	შიდა ქართლი	ქარელი
8976/97-G	43	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1997	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	ქარელი
8977/97-G	44	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1997	ხორბალი	შიდა ქართლი	ქარელი
8978/97-G	45	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1997	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	ქარელი
8979/97-G	46	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	1997	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	ქარელი
8980/97-G	47	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	1997	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	ქარელი
1469/02-G	48	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2002	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
1470/02-G	49	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	2002	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
2024/02-G	50	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2002	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ნინოწმინდა
2025/02-G	51	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2002	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ნინოწმინდა
2026/02-G	52	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2002	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ნინოწმინდა
2027/02-G	53	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2002	მღრღნელი	სამცხე-ჯავახეთი	ნინოწმინდა
4754/04-G	54	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	2004	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
4755/04-G	55	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2004	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
4777/04-G	56	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4778/04-G	57	147	384	441	337	Ft.B.Br.028	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4779/04-G	58	147	346	446	337	Ft.B.Br.030	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4780/04-G	59	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4781/04-G	60	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4787/04-G	61	147	346	446	337	Ft.B.Br.031	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4788/04-G	62	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4790/04-G	63	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2004	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
4791/04-G	64	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	2004	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
4792/04-G	65	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2004	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
4803/04-G	66	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4804/04-G	67	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4807/04-G	68	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4808/04-G	69	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4809/04-G	70	147	346	446	337	Ft.B.Br.031	2004	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
4810/04-G	71	147	346	446	337	Ft.B.Br.031	2004	გამაზისებური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა

4811/04-G	72	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	2004	იქსოდური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
4812/04-G	73	147	337	446	337	Ft.B.Br.029	2004	გამაზისებური ტკიპა	სამცხე-ჯავახეთი	ასპინძა
6955/07-G	74	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2007	წყალი	შიდა ქართლი	კასპი
6956/07-G	75	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2007	წყალი	შიდა ქართლი	კასპი
6957/07-G	76	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2007	წყალი	შიდა ქართლი	კასპი
6958/07-G	77	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2007	წყალი	შიდა ქართლი	კასპი
7435/07-G	78	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2007	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
7436/07-G	79	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2007	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
7437/07-G	80	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2007	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
7573/07-G	81	147	346	446	337	Ft.B.Br.032	2007	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
7574/07-G	82	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2007	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
8896/08-G	83	147	384	441	337	Ft.B.Br.028	2008	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
8897/08-G	84	147	393	441	337	Ft.B.Br.028	2008	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
8898/08-G	85	147	337	446	337	Ft.B.Br.027	2008	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
8932/08-G	86	147	393	441	337	Ft.B.Br.028	2008	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
8933/08-G	87	147	402	441	337	Ft.B.Br.028	2008	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
10351/09-G	88	147	393	441	337	Ft.B.Br.028	2009	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
10352/09-G	89	147	393	441	337	Ft.B.Br.028	2009	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
10353/09-G	90	147	393	441	337	Ft.B.Br.028	2009	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
967/10-G	91	147	337	441	337	Ft.B.Br.028	2010	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
968/10-G	92	147	393	441	337	Ft.B.Br.028	2010	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
969/10-G	93	147	393	441	337	Ft.B.Br.028	2010	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
1296/11-G	94	147	402	441	337	Ft.B.Br.028	2011	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
1297/11-G	95	147	402	441	337	Ft.B.Br.028	2011	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
1298/11-G	96	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2011	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
1300/11-G	97	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2011	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
1309/11-G	98	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2011	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
1688/12-G	99	147	328	441	337	Ft.B.Br.028	2012	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
1689/12-G	100	147	328	441	315	Ft.B.Br.028	2012	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
1690/12-G	101	147	328	441	315	Ft.B.Br.028	2012	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
1691/12-G	102	147	328	441	315	Ft.B.Br.028	2012	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	კასპი
1720/12-G	103	147	393	441	337	Ft.B.Br.028	2012	იქსოდური ტკიპა	შიდა ქართლი	გორი
LVS	LVS	147	355	446	315	B.Br.014		დესუჯეც. ცოცხალი ვაქცინა		
SchuS4	SchuS4	177	439	441	315	A.I.Br.002		WRAIR, დნმ		

შედეგების ინტერპრეტაცია

ტულარემიის გავრცელების რამოდენიმე თეორია არსებობს. მათგან ერთერთის მიხედვით ამ პათოგენის გავრცელება ჩრდილო ამერიკის კონტინენტიდან მოხდა (Vogler et al. 2009b). ამ თეორიას ადასტურებს ისიც, რომ *F. tularensis* ქვესახეობა *holarctica* შედარებით მოკლე ფილოგენეტიკური წარსულით გამოირჩევა. მისი კლონალურობისა და გენომის მაღალ-კონსერვატიულობის დამადასტურებელია ამ ქვესახეობის ფარგლებში აღმოჩენილი SNP მუტაციების მცირე რაოდენობაც. მრავალი მეცნიერი ეთანხმება მოსაზრებას, რომ იგი მნიშვნელოვანი გენეტიკური ცვლილების შედეგად წარმოიქმნა და მხოლოდ ამის შემდეგ გავრცელდა მთელ ჩრდილოეთ ნახევარსფეროში.

ევროპისა და აზიის გასაყარზე მოპოვებული ქართული შტამების შესწავლამ დამატებითი მონაცემები შეიტანა ამ სფეროში. ქართული შტამები კანონიკური SNP ტიპირების შედეგად მოთავსდნენ B.Br.013 ჯგუფში, ხოლო სექვენირებული შტამისა და *F. tularensis* სხვა მთლიანი გენომების შედარების შემდეგ აღმოჩნდა, რომ ის ბაზალურია ამ ჯგუფის სხვა წევრებთან შედარებით და თავსდება განცალკევებულ განშტოებაში B.Br.027. შედეგად, აქამდე აღწერილი B.Br.013 ქვეჯგუფი გაიყო ორ განშტოებად, რომელთაგან ერთერთი ამ ჯგუფში მანამდე შემავალი ევროპული (B.Br.026) შტამები მოთავსდა, ხოლო მეორეში - ქართული (B.Br.027) (Vogler et al. 2009b; Svensson K, et al. 2009) (სურ. 34). ამასთან, სექვენირებისათვის სწორად შერჩეული შტამის (F0673) შედეგი იყო ქართული ქვეჯგუფის შიგნით ნანახი ექვსი განშტოება (Larsson P, et al. 2007; Pearson T, et al. 2004).

ქართული (B.Br.027) განშტოება გეოგრაფიულად გამოცალკევებულია ევროპული განშტოებისაგან (B.Br.026) და მოიცავს შტამებს საქართველოსა და უკრაინიდან, მაშინ როცა B.Br.026 ქვეჯგუფი გავრცელებულია მთელ ცენტრალურ და აღმოსავლეთ ევროპაში. თუმცა აზიიდან და საქართველოს მეზობელი ქვეყნებიდან იზოლატების შესახებ ინფორმაციის სიმწირის გამო B.Br.027 ქვეჯგუფში შემავალი შტამების გავრცელების შესახებ ძნელია დასკვნების გაკეთება, ერთი რამ ცხადია, ამ ქვეჯგუფის შტამები ცენტრალურ ევროპაში არ გვხვდება. დღეისათვის არსებული მონაცემების მიხედვით, B.Br.013 და B.Br.FtNF002-00 ჯგუფების საერთო წინაპარი, რომელიც ასევე

ქართული B.Br.027 და საქართველოს ჩრდილოეთით მდებარე B.Br.026 ქვეჯგუფების საერთო წინაპარიცაა, საქართველოდან ჩრდილო-დასავლეთით იყო გავრცელებული. თუმცა შუა აზიიდან მონაცემების შევსებამ შესაძლოა სურათი შეცვალოს. დღესდღეობით ევრაზიაში ტულარემიის გავრცელების თეორია სკანდინავიის ნახევარკუნძულიდან ყველაზე რეალური რჩება, რადგან ეს ჯგუფი ფილოგენეტიკურად ყველაზე მრავალფეროვან შტამებს მოიცავს, მათ შორის B.Br.013 ჯგუფ-ში/თან(?) ბაზალურად განლაგებულებსაც (Vogler et al. 2009b).

ყოველივე ზემოთქმული ადასტურებს, რომ ქართული შტამები, ისევე, როგორც ყირიმში გამოყოფილი ორი იზოლატი, ფილოგენეტიკურად დაშორებულია *F. tularensis* ქვესახეობის *holarctica* მანამდე აღწერილ პოპულაციებს. ამასთან, მიღებული შედეგები ადასტურებს, რომ ქართული შტამების ქვეტიპები არ არის მჭიდროდ დაკავშირებული საქართველოს რომელიმე გეოგრაფიულ არეალთან და გავრცელებულია აღმოსავლეთ საქართველოს ტულარემიის კერებში. თუმცა ამ ტიპის შტამების გეოგრაფიული გავრცელების შესახებ შემდგომი დასკვნების გაკეთება ამ ეტაპზე შეზღუდულია მეზობელი ქვეყნებიდან ინფორმაციის ნაკლებობის გამო.

NAU-ში ქართული შტამების MLVA-11, ხოლო დესჯეც-ში MLVA-25 ტიპირებისას ჰომოპლაზიას ადგილი არ ჰქონია. ორივე მეთოდის შეჯამებით, მიღებული იყო 8 უნიკალური, თუმცა ფილოგენეტიკურად არამდგრადი გენოტიპი, რომელთა შორის ფილოგენეტიკური კავშირების დადგენა ვერ მოხერხდა: ერთი MLVA გენოტიპი რამოდენიმე SNP ქვეჯგუფში იყო გადანაწილებული და პირიქით, ერთი SNP ქვეჯგუფი რამოდენიმე MLVA გენოტიპით იყო წარმოდგენილი. ყველაზე ბაზალური ქართული SNP ჯგუფი (B.Br.027/028) წარმოდგენილი იყო ერთი MLVA გენოტიპით, რომელიც იმავე ქვეჯგუფში შემავალ ყირიმის შტამებს განსხვავებული MLVA პროფილით გამოეყო. B.Br.028/029 ქვეჯგუფის ქართულმა იზოლატებმა 6 MLVA გენოტიპი გამოავლინა. ქვეჯგუფი B.Br.029/030 ერთი MLVA გენოტიპით იყო წარმოდგენილი, ხოლო B.Br.030/031, B.Br.031/032 და ტერმინალურმა B.Br.032 საერთო MLVA პროფილი გაიზიარეს.

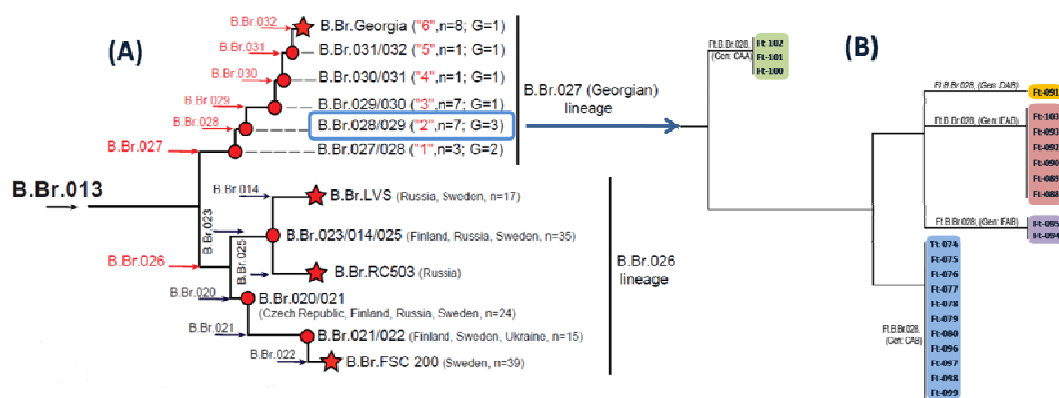
როგორც სურ. 34-დან ჩანს MLVA პროფილების მრავალფეროვნება იკლებს განშტოების ბოლო ქვეჯგუფებში, რომლებსაც შედარებით მოკლე ევოლუციური ასაკი გააჩნიათ. ეს მოსაზრება დესჯეც კოლექციის ბოლო ხუთი წლის განმავლობაში იზოლირებული შტამების MLVA შედეგების ანალიზით კიდევ ერთხელ დადასტურდა.

ცხრილი - 20. 2007-2012 წლებში იზოლირებული B.Br.028 შტამების MLVA გენოტიპები

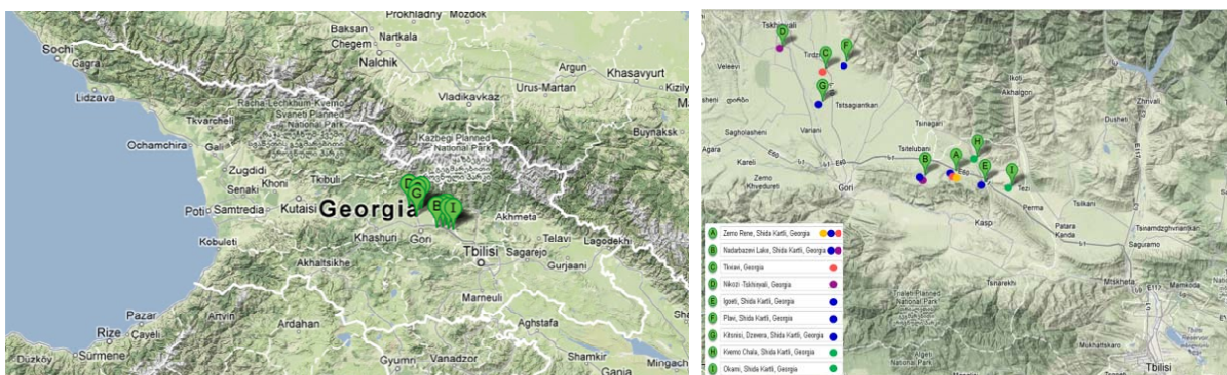
SNP ქვეჯგუფი	დნმ #	VNTR Ft-M3	VNTR Ft-M4	VNTR Ft-M6	წყარო	რეგიონი	კერა	გამოყოფის თარიღი
Ft.B.Br.028	Ft-074	C	A	B	წყალი	კასპი, ს. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2007/იანვ.
Ft.B.Br.028	Ft-075	C	A	B	წყალი	კასპი, ს. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2007/იანვ.
Ft.B.Br.028	Ft-076	C	A	B	წყალი	კასპი, ს. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2007/იანვ.
Ft.B.Br.028	Ft-077	C	A	B	წყალი	კასპი, ს. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2007/იანვ.
Ft.B.Br.028	Ft-078	C	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	კასპი, ს. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2007/აპრ.
Ft.B.Br.028	Ft-079	C	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	გორი, ს. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი	2007/აპრ.
Ft.B.Br.028	Ft-080	C	A	B	<i>Hm. otophila</i>	გორი, ს. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი	2007/აპრ.
Ft.B.Br.032	Ft-081	H	B	B	<i>Derm. marginatus</i>	გორი, ს. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი	2007/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-082	C	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	გორი, ს. ტყვიავი	შიდა ქართლი	2007/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-083	E	A	B	<i>Hm. otophila</i>	კასპი, ს. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2008/მარ.
Ft.B.Br.028	Ft-084	F	A	B	<i>Hm. otophila</i>	კასპი, ს. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2008/მარ.
Ft.B.Br.027	Ft-085	D	B	B	<i>Hm. otophila</i>	გორი, ს. ლამისყანა	შიდა ქართლი	2008/მარ.
Ft.B.Br.028	Ft-086	F	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	კასპი, ს. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2008/ინვ.
Ft.B.Br.028	Ft-087	G	A	B	<i>Hm. sulcata</i>	კასპი, ს. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2008/ივნ.
Ft.B.Br.028	Ft-088	F	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	კასპი, სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2009/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-089	F	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	კასპი, სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2009/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-090	F	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	კასპი, სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2009/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-091	D	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	კასპი, სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2010/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-092	F	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	კასპი, სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2010/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-093	F	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	კასპი, სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2010/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-094	G	A	B	<i>Hm. otophila</i>	გორი, ს. ნადარბაზევი	შიდა ქართლი	2011/აპრ.
Ft.B.Br.028	Ft-095	G	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	გორი, ს. ნიქოზა	შიდა ქართლი	2011/აპრ.
Ft.B.Br.028	Ft-096	C	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	კასპი, ს. იგოეთი	შიდა ქართლი	2011/აპრ.
Ft.B.Br.028	Ft-097	C	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	გორი, ს. ფლავი	შიდა ქართლი	2011/აპრ.
Ft.B.Br.028	Ft-098	C	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	გორი, ს. კიწნისი	შიდა ქართლი	2011/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-099	C	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	კასპი, სოფ. ზემო რენე	შიდა ქართლი	2012/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-100	C	A	A	<i>Derm. marginatus</i>	კასპი, ს. ქვემო ჭალა	შიდა ქართლი	2012/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-101	C	A	A	<i>Hm. sulcata</i>	კასპი, ს. ქვემო ჭალა	შიდა ქართლი	2012/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-102	C	A	A	<i>Hm. punctata</i>	კასპი, ს. ოკამი	შიდა ქართლი	2012/მაისი
Ft.B.Br.028	Ft-103	F	A	B	<i>Derm. marginatus</i>	გორი, ს. ტყვიავი	შიდა ქართლი	2012/მაისი
Ft.B.Br.014	LVS	B	B	A	ცოცხალი სავაქცინო შტამი	-	-	-
Ft.AI.Br.002	SchuS4	A	A	A	რეფერენსული დნმ	-	-	-

ასე მაგალითად, სოფ. რენეში ტულარემიის აფეთქების შემდგომ ამ არეალში ინტენსიური სავლე სამუშაოები ტარდებოდა. შედეგად, 2007-დან 2012 წლამდე იზოლირებული 30 შტამიდან 16 სოფ. რენეს მიმდებარე ტერიტორიაზე იყო მოპოვებული, ხოლო დანარჩენი 14 ქართლის სხვა რაიონებში. ამ 30 შტამიდან 28 B.Br.028 ქვეჯგუფში შედიოდა და მხოლოდ 2 შტამი ეკუთვნოდა სხვა SNP ჯგუფებს: B.Br.032 და B.Br.027. ამავე შტამების MLVA ანლიზის შედეგად B.Br.028 ქვეჯგუფში ჰიპერვარიანტული Ft-M3 მარკერის მიხედვით გამოვლინდა 4 ქვეტიპი, რომელთაგან ერთერთი სრულიად ახალ ალელს განეკუთვნებოდა. გარდა ამისა, Ft-M6 მარკერი, რომელიც ყოველთვის ერთსა და იმავე ალელით იყო წარმოდგენილი ყველა ქართულ შტამში, კასპის რაიონის სოფ. ოკამსა (1) და სოფ. ქვემო ჭალაში (2) 2012 წელს იზოლირებულ სამ ახალ შტამში, ახალი, რეფერენსული შტამების მსგავსი ზომით ხასიათდებოდა.

აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ ამ დრომდე, კასპის რაიონის ამ სოფლებიდან შტამების იზოლაცია არ მომხდარა. ამასთან, ორი, სრულიად ახალი MLVA გენოტიპის მქონე გარემო ნიმუშები 2007 წლის ტულარემიის აფეთქების ეპიცენტრის, სოფ. რენეს მიმდებარე სოფლებში იყო მოპოვებული. ამიტომ, შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ ბუნებრივ პირობებში შტამების ხუთწლიანი ცირკულაციის დროს ადგილი ჰქონდა ჰიპერვარიანტული VNTR მარკერის მუტაციას.



სურათი 35. A) ქართული ქვეჯგუფის ფილოგენეტიკური ხე B.Br.013 ჯგუფის შიგნით (Chanturia et al, 2009). (n) - NAU-ში გამოკვლეული შტამების რაოდენობა, (G) - NAU-ში მიღებული MLVA გენოტიპების რაოდენობა; B) 2009-2012 წლებში იზოლირებული B.Br.028 შტამების MLVA გენოტიპები. ფრჩხილებში მოცემულია M3, M4 და M6 მარკერების კომბინაციები.



სურათი 36. 2007-2012 წლებში იზოლირებული B.Br.028 შტამების MLVA გენოტიპების გეოგრაფიული გადანაწილება

MLVA გენოტიპების გეოგრაფიულ განაწილებას შიდა ქართლის ტერიტორიაზე არ ჰქონდა კანონზომიერი ხასიათი (სურ. 36). თუმცა უნდა აღნიშნოს, რომ გენოტიპების სიჭარბე იქ გვხვდებოდა, სადაც ნიმუშების მოპოვება უფრო ინტენსიურად მიმდინარეობდა. ახალ გამოკვლეულ ტერიტორიებზე აღმოჩენილი ახალი MLVA ვარიაციები გენოტიპების უფრო დიდ მრავალფეროვნებასა და ფართე გავრცელებაზე უნდა მეტყველებდეს. ამასთან, შიდა ქართლის ტერიტორიაზე ბოლო 5 წლის მანძილზე ერთი და იგივე B.Br.028 SNP ქვეჯგუფის ინტენსიური ცირკულირებაც შესაძლოა ტულარემიის გაცილებით აქტიური კერის არსებობაზეც მიუთითებდეს.

მიუხედავად იმისა, რომ კლინიკური ნიმუშებიდან ვერცერთი ბაქტერიული კულტურის მიღება ვერ მოხერხდა, MLVA მეთოდის გამოყენებით შესაძლებელი გახდა აფეთქების დროს მოპოვებული ნიმუშებისა და მოგვიანებით, გარემოდან მიღებული კულტურების შედარება, ეპიდემიოლოგიური კვლევის ჩატარება და ინფექციის წყაროს დადგენა: ერთმანეთს დაემთხვა სოფ. რენეში მომხდარი აფეთქების დროს მოპოვებული კლინიკური ნიმუშების, ამავე სოფელში სასმელი წყლიდან გამოყოფილი *F. tularensis* კულტურებისა და მოგვიანებით სოფლის მიმდებარე ტერიტორიაზე ექტოპარაზიტების ემულსიება და მათგან მიღებულ შტამებში გამოვლენილი MLVA გენოტიპები.

სწრაფი MLVA ტიპირების მეთოდი, როგორც უკვე აღვნიშნეთ, გამოსადეგია, როგორც არქივირებული საკოლექციო შტამების, ასევე კლინიკური სადიაგნოსტიკო მასალისა და ვექტორების ემულსიების უშუალო ტიპირებისათვის. ამასთან, ისეთ გარემო ნიმუშებში, როგორიცაა მაგალითად ტკიპების ემულსია, MLVA მეთოდის

გამოყენებით შესაძლებელია განსხვავებული გენოტიპების მქონე შერეული შტამების გამოვლენა, მაშინ როცა კულტურის მიღების შემდეგ მეტწილად ერთი გენოტიპი რჩება. მსგავსი ინფორმაცია შესაძლოა ძალზედ მნიშვნელოვანი აღმოჩნდეს ინფექციის პირველწყაროს დადგენის პროცესში.

ორივე ერთად, SNP და MLVA მეთოდები ურთიერთშემავსებელ შედეგებს იძლევა: პირველი, ათავსებს იზოლატებს ფილოგენეტიკურ ქვეჯგუფებში, ხოლო მეორე განსაზღვრავს ამ ქვეჯგუფებში შემავალი შტამების გენეტიკურ მრავალფეროვნებას. საზოგადოდ, SNP მუტაციების მთლიანი გენომების შედარების გზით აღმოჩენას გაცილებით მეტი გარჩევადობის უნარი აქვს, ვიდრე MLVA. სამაგიეროდ ეს უკანასკნელი არ საჭიროებს მთლიანი გენომის სექვენირების ხანგრძლივ და ძვირადღირებულ პროცესს, ნაკლებ შრომატევადია და მოკლე დროში შეუძლია რამოდენიმე მაღალპოლიმორფული უბნის ტიპირებით გენეტიკური ჯგუფების გამოვლენა.

ყოველივე ზემოთქმული ხაზს უსვამს ტულარემიის კერებში მიზანმიმართული და ინტენსიური საველე სამუშაოების ჩატარების, ასევე მოსახლეობაში, შინაურსა და გარეულ ცხოველებში სერო-პრევალირების შესწავლის აუცილებლობას.

დასკვნები

1. სხვადასხვა მოლეკულური მეთოდების გამოყენებით დახასიათებულია დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის კოლექციაში არსებული *F. tularensis* 103 შტამი.
2. ყველა ქართული შტამი მოლეკულურ დონეზე დატიპირდა, როგორც *F. tularensis* ქვესახეობა *holarctica*.
3. პირველადი PFGE ტიპირების შედეგად ქართულ შტამებს შორის განსხვავების დადგენა ვერ მოხერხდა ბაქტერიის კონსერვატიული / კლონალური ხასიათის გამო.
4. MLVA ტექნოლოგიის გამოყენების შემდეგ ქართულ შტამებს შორის 8 უნიკალური ქვეჯგუფი გამოიკვეთა.
5. წარმატებით მოხერხდა MLVA მეთოდის გამოყენება უშუალოდ კლინიკურ და გარემო ნიმუშებზე, რაც მომავალში საშუალებას მოგვცემს ტულარემიის შემთხვევასთან დაკავშირებული ეპიდემიოლოგიური კვლევები იზოლატის მიღებამდე ვაწარმოთ. ამასთან, სწრაფი MLVA ტიპირების მეშვეობით ისეთ გარემო ნიმუშებში, როგორიცაა მაგ. ვექტორების ემულსიები, შერეული გენოტიპების გამოვლენის საშუალება მოგვეცა. ეს მონაცემები შესაძლოა ძალიან მნიშვნელოვანი აღმოჩნდეს გარემო ნიმუშსა და კლინიკურ შემთხვევას შორის ურთიერთკავშირების დასადგენად.
6. ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტთან თანამშრომლობით შევიმუშავეთ ქართული *F. tularensis* შტამებისათვის სპეციფიკური SNP ტესტების პანელი, რომელიც MLVA მარკერებთან ერთად ახალი გამოყოფილი შტამების ზუსტი გენეტიკური დახასიათების საშუალებას გვაძლევს.
7. ამავე კოლაბორაციის ფარგლებში მოვახდინეთ ქართული *F. tularensis* შტამების ფილოგენეტიკური ანალიზი და მათი გლობალურ / მსოფლიო მონაცემთა ბაზაში განთავსება:
 - i. ქართული შტამები, ყირიმის ორ შტამთან ერთად მოთავსდა ადრე აღწერილ B.Br.013 ჯგუფში, რომელიც აქამდე მხოლოდ ცენტრალურ და აღმოსავლეთ ევროპაში იზოლირებულ შტამებს მოიცავდა.

ii. ქართული ქვეჯგუფი გეოგრაფიულად და გენეტიკურად განცალკევებულ და ფილოგენეტიკურად ყველაზე ძველ B.Br.027 განშტოებაში მოთავსდა.

8. ამ ნაშრომის წყალობით მცირეოდენი ნათელი მოეფინა ევროპისა და აზიის გასაყარზე მყოფ გეოგრაფიულ ზოლში გავრცელებული *F. tularensis* თავისებურებებს და თვალსაჩინო გახდა მეზობელი ქვეყნების ტერიტორიაზე გავრცელებული შტამების შესწავლის აუცილებლობა.

Ilia State University

Gvantsa Chanturia

Molecular and Epidemiological Characterization of *Francisella tularensis*

Strains Isolated in Georgia, PhD Thesis

Summary

Introduction

Tularemia is well known zoonotic disease of the Northern Hemisphere, which is spread by small intracellular microorganism *Francisella tularensis*. This pathogen was first isolated by George McCoy and Charles Chapin in Tulare County, California in 1912. Later in 1919 Edward Francis isolated it from human blood. In 1925 Hachiro Ohara described a tularemia case in Japan.

F. tularensis belongs to the genus *Francisella* and includes four subspecies – *F. tularensis tularensis* (type A), *F. tularensis holarctica* (type B), *F. tularensis mediaasiatica* and *F. tularensis novicida*. Disease tularemia is mainly caused by first two subspecies - types A which can be found only on the North American continent and type B that is spread in the whole Northern Hemisphere.

F. tularensis was recognized in Georgia first time in 1946 with the investigation of an outbreak at a military garrison in South Georgia. Since that time *F. tularensis* was routinely monitored in environmental sampling undertaken by the Georgian Anti-Plague Station (APS) between 1950 and 1991 that was renamed as Scientific Practical Center Against Especially Dangerous Infections from 1992 and the National Center for Disease Control (NCDC) between 1996 and 2012. There have been three waterborne outbreaks of principally Oropharyngeal tularemia described in Georgia: 1946 and 1984 in the south, and 2007 in the middle of Georgia. During that last large outbreak in January 2007 which occurred in Zemo Rene, a small village in the Kaspi Region, 26 human cases of tularemia were confirmed. Four isolates were obtained from the drinking water source in the center of the village.

In total 465 environmental isolates were obtained during that period from two main tularemia foci of Georgia. 103 *F. tularensis* strains are still kept in National Collection of Bacteria and Viruses of NCDC.

After 60-years of observation, two principle tularemia foci were highlighted in the territory of East Georgia: Kartli-Kakheti and Meskhet-Javakheti. The first includes three big regions of Shida Kartli (micro foci: Kaspi-Rene, Gori-Kareli, Tskhinvali-Khetagurov), Kvemo Kartli (micro foci: Dmanisi-Irganchai) and Kakheti (micro foci: Telavi-Pshaveli, Dedoplistskaro-Arkhiloskalo (near Azerbaijan border)). These regions are geographically located mostly in valley and foothill areas where elevation is around 800m above sea level. The main rodent reservoir/amplifiers in this natural foci are *Microtus socialis* and *Apodemus sylvaticus*. The main tick reservoir/vectors - *Ixodes sp.*, *Haemaphysalis sp.*, as well as *Gamazidae ticks* and *fleas*. The exception is Dmanisi region (micro foci: Irganchai), Kvemo Kartli focus, which is located above 1200m in eastern part of Small Caucasus mountain chain and connects to Javakheti Plateau. Rodent reservoirs here are changed to *Mictorus arvalis*, *Arvicola terrestris* and *Apodemus sylvaticus*, and ectoparasite vectors are more switched to *Gamazidae ticks* and *fleas* along with *Ixodes sp.*.

Meskhet-Javakheti natural foci includes Meskheti and Javakheti regions and Erusheti Upland (Turkey border). This area is located in South-East part of Georgia on Small Caucasus system chain. Elevation here is significantly high – 900-1400m in Meskheti - Akhaltsikhe basin (micro foci: Minadze-Sakuneti, Oshora-Ota, Klde-Kikineti), 1700-2000m in Javakheti Plateau (micro foci: Turtskhi-Varevani, Saghamo-Gandza, Gorelovka) and 1800-2800m in Erusheti Upland. The main role in transmission of disease have rodents – *Microtus arvalis*, *Apodemus sylvaticus* and *Arvicola terrestris* (in Javakheti) and *Gamazidae ticks* and *fleas*, while *Ixodes sp.*, could be found only in Meskheti and Erusheti area.

There are no registered tularemia cases and no *F. tularensis* isolates from West Georgia. But this part of country could not be stated as free from tularemia without sufficient information regarding spread of infection in nature and a seroprevalence study of the population.

Aim of the study

The aim of this study was phylogenetic characterization of 103 *F. tularensis* strains from NCDC collection;

To place the Georgian isolates into an existing global phylogeographic framework;

And to develop genotyping assays for rapid typing of newly isolated strains as well as clinical and environmental samples.

Methods

F. tularensis detection and isolation was performed by direct plating on CHAB agar and bioassay on mice, confirmed by slide agglutination and real-time PCR (*F. tularensis* Detection Kit, Idaho Technology, Target1, Target2). Standard DNA isolation was performed using Qiagen DNA Mini Kit. For Whole Genome Sequencing (WGS) DNA of selected strain was isolated with chlorophorm extraction method.

For molecular typing of *F. tularensis* strains Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) techniques were applied. Live Vaccine Strain (LVS) and SchuS4 DNA samples were used as a reference.

Georgian-specific SNP discovery was performed by comparison of available and newly sequenced Georgian strains at Northern Arizona University (NAU). From discovered SNPs, PCR assays were designed for using both, Melt-MAMA (Mismatch Amplification Mutation Assay) real-time and gel platforms.

MLVA-25 and MLVA-11 systems on Beckman Coulter CEQ-8000 and ABI 3130XL platforms subsequently, were used for subtyping inside the SNP groups and for discrimination among the outbreak strains.

Results & Discussions

PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

For preliminary characterization of *F. tularensis* strains PFGE methodology was applied. 52 *F. tularensis* strains isolated from different foci of Georgia and Live Vaccine Strain (LVS)

were processed as described in protocol for *Salmonella typhimurium* (PulseNet, 1999) using CHEF-DR II System, BioRad. For DNA digestion endonucleases XhoI and BamHI were used.

All Georgian strains had the same PFGE profile after digestion with restriction enzyme XhoI. Only one additional band was found in LVS. For several strains restriction enzyme BamHI was tried, but result was identical for all strains including LVS.

MLVA (Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis)

For further analysis of *F. tularensis* strains MLVA technique was applied using 25-VNTR marker system (Johansson A. et al.2004) on CEQ 8000 Beckman Coulter platform. All 25 MLVA markers were used for typing 17 Georgian isolates of *F. tularensis* along with LVS as a reference strain. Three of them (Ft-M3, Ft-M4, Ft-M6) revealed in total 3 unique MLVA genotypes different from LVS and SCHU-S4. All Georgian *F. tularensis* isolates from NCDC collection were typed as *F. tularensis holarctica* (Type B) using the Type B-specific C1-C4 marker.

These variable markers along with the type B specific C1-C4 marker were used for subtyping of the remaining *F. tularensis* strains from NCDC collection and revealed a total of 8 unique genotypes across all Georgian strains.

After typing with the new MLVA-11 system (VoglerAJ, et al. 2009a) at NAU, AZ, USA, the same to MLVA-25 pattern was observed across 25 Georgian strains by revealing five genotypes unique for Georgian strains;

MLVA typing method was applied straight to PCR positive DNA samples isolated from clinical samples and vector species preparations collected during seasonal field works. The variable Ft-M3, Ft-M4 markers were used. Results revealed identical genotypes in v. Rene outbreak clinical samples and obtained isolates from water source of the same village and echtoparasite preparations from the surrounding village area. Moreover, after application of MLVA methodology to environmental samples, mixed genotypes in one tube were detected, while after plating or bioassay only one is left. After testing of isolates from the same tick preparations MLVA typing results revealed the same genotypes.

On the next stage the variable Ft-M3, Ft-M4 and Type B-specific C1-C4 markers were pooled in multiplex assay and used for rapid MLVA typing of all 103 archival strains, 2 bubo

aspirates and 13 echtoparasite preparations. Results were identical to those received from each marker separately.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

25 Georgian *F. tularensis* DNA samples were sent to Northern Arizona University (NAU) for Whole Genome Sequencing (WGS) of one strain; Assay design for newly discovered SNPs; Canonical SNP (canSNP) analyses across 25 Georgian strains and MLVA-11 System Typing.

On the first stage 25 Georgian strains were typed using published melt-MAMA canSNP assays (Vogler et al. 2009b), which grouped Georgian strains with B.Br.013/014 subclade.

In the same time, Georgian isolate (F0673), representing the most common MLVA profile type of *F. tularensis* subsp. *holarctica* found in the country of Georgia was sequenced using Illumina's Genome Analyzer II (San Diego, CA). Coverage plot of Illumina short sequence reads for Georgian strain was aligned to LVS what revealed new Georgian B.Br.027 lineage as basal to the other diversified European lineages in the B.Br.013 group. The previously described B.Br.013/014 lineage was renamed to B.Br.026.

Out of 39 putative SNPs unique to Georgian lineage 21 SNPs were incorporated into genotyping assays compatible with a real-time PCR and agarose gel platforms. After typing of all collection strains the structure of six subclades (Ft.B.Br.027, Ft.B.Br.028, Ft.B.Br.029, Ft.B.Br.030, Ft.B.Br.031, Ft.B.Br.032) in Georgian lineage were identified. Single SNP as canonical representative was designating for each branch.

With combining CanSNPs and MLVA data these techniques exhibited considerable congruence in identifying genetic groups. MLVA subtyping revealed a higher level of genetic diversity in phylogenetically older SNP groups: The most basal Georgian subclade, B.Br.027 was comprised of a single Georgian isolate that was distinguishable from the two Crimean isolates in the same subclade due to a distinct MLVA genotype. There were six MLVA genotypes among the 33 Georgian isolates within subclade B.Br.028. A single MLVA genotype was represented among 35 Georgian isolates in subclade B.Br.029, and last three subclades (B.Br.030, B.Br.031 and B.Br.032) that contained 3, 8 and 23 isolates subsequently shared single MLVA genotype.

Conclusions

In this study, was determined the phylogenetic structure of *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates from the European/Asian juncture country of Georgia. Was described a new subpopulation within the B.Br.013 branch that is the most basal within this group and is genetically and geographically distinct. Isolates from this new Georgian lineage were also found in the Crimea, Ukraine.

103 *F. tularensis* strains that represent current NCDC collection were typed using different molecular methods. All Georgian were typed as *F. tularensis holarctica* (Type B).

Were highlighted 6 SNP subclades and 8 MLVA genotypes across Georgian strains that appear to be different from those described in Western Europe and other part of the Northern hemisphere. MLVA subtyping revealed higher level of genetic diversity in phylogenetically older SNP groups. Together, SNPs and MLVA provide complementary approaches by placing isolates in a phylogeny and discriminating among subclades.

MLVA methodology showed the high discriminatory power and it is very useful for subtyping archival collection isolates, for detection and subtyping directly from clinical diagnostic material and vector species preparations.

The technology of rapid molecular typing system can contribute in preliminary analysis of human cases and find the epidemiological pathways of disease. It can also be very helpful during strain isolation process from environmental sample and can show in advance the preliminary number of mixed strains.

The isolation of *F. tularensis* strains in Georgia was mostly performed in plague foci due to *Yersinia pestis* oriented field works, or in the vicinity of tularemia outbreaks or sporadic cases in east part of the country. These findings emphasize the need for more intensive tularemia-oriented sampling and for the screening of animal and human serum samples to gather data to support preventive strategies.

პუბლიკაციები

სტატიები

Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays (Melt-MAMA): A Functional Study of a Cost-Effective SNP Genotyping Assay in Bacterial Models, Birdsell DN et al. (2012). D. N. Birdsell, T. Pearson, E. P. Price, H. M. Hornstra, R. D. Nera, N. Stone, J. Gruendike, E. L. Kaufman, A. H. Pettus, A. N. Hurbon, J. L. Buchhagen, N. J. Harms, G. Chanturia, M. Gyuranecz, D. M. Wagner, P. S. Keim, PLoS ONE, March 2012, Volume 7, Issue 3, e32866.

Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* from the country of Georgia, G. Chanturia, D. N Birdsell, M. Kekelidze, E. Zhgenti, G. Babuadze, N. Tsertsvadze, S. Tsanava, P. Imnadze, S. M Beckstrom-Sternberg, J. S Beckstrom-Sternberg, M. D Champion, S. Sinari, M. Gyuranecz, J. Farlow, A. H Pettus, E. L Kaufman, J. D Busch, T. Pearson, J. T Foster, A. J Vogler, D. M Wagner and P. Keim, BMC Microbiology 2011, 11:139, doi:10.1186/1471-2180-11-139

პოსტერები

Molecular typing of *Francisella tularensis* strains isolated in the country of Georgia during 2009-2012, G. Chanturia, N. Tsertsvadze, M. Kekelidze, M. Zakalashvili, E. Zhgenti, M. Gaprindashvili, P. Imnadze, M. Nikolich, J. Farlow, N. Avaliani, E. M. Barry, 7th International Conference on Tularemia, Beaver Run Resort, Breckenridge, CO, USA, 17-20 Sep. 2012

Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* from the country of Georgia, G.Chanturia, D. N.Birdsell, M.Kekelidze, E.Zhgenti, G.Babuadze, E.Khmaladze, N.Tsertsvadze, P.Imnadze, M.Nikolich, J.Farlow, S.Beckstrom-Sternberg, A.Vogler, P.Keim, 9th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting, February 6-9, 2011

Molecular typing of *Francisella tularensis* strains isolated in Georgia, G.Chanturia, E.Zhgenti, M.Zakalashvili, M.Kekelidze, E.Garcia, V.H.I.Lao, J.Elliott, P.Chain, N.Tsertsvade, L.Bakanidze, P.Imnadze, Abstract for 6th International Conference on Tularemia, Berlin, Germany, September 13-16, 2009

გამოყენებული ლიტერატურა:

Akhundov M., (1969), Epidemiology and Epizootology of Tularemia in Azerbaijan SSR, Doctoral Dissertation Thesis, 1969 (on Russian).

Berdal et al. (2000). Field detection of *Francisella tularensis*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 32:287–291.

Broekhuijsen M et al. (2003). Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:2924–2931.

Burke DS (1977). Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory acquired tularemia. *The Journal of Infectious Diseases*, 135(1):55–60.

Byström M et al. (2005). Tularemia in Denmark: identification of a *Francisella tularensis* subsp. *holartica* strain by real-time PCR and high-resolution typing by multiple-locus variablenumber tandem repeat analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:5355–5358.

Chaudhuri R.R., et al (2007) - Chaudhuri RR, Ren C, Desmond L, Vincent GA, Silman NJ, Brehm JK, Elmore MJ, Hudson MJ, Forsman M, Isherwood KE, Gurycová D, Minton NP, Titball RW, Pallen MJ, Vipond R. Genome Sequencing Shows that European Isolates of *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* Are Almost Identical to US Laboratory Strain Schu S4. *PLoS ONE* 2(4): e352.

Chitadze N., et al, (2009), T. Kuchuloria, D.V. Clark, E. Tsertsvadze, M. Chokheli, N. Tsertsvadze, N. Trapaidze, A. Lane, L. Bakanidze, S. Tsanova, M.J. Hepburn, P. Imnadze, Water-Borne Outbreak of Oropharyngeal and Glandular Tularemia in Georgia: Investigation and Follow-up, *Infection* 2009; 37: 514–521.

Chu MC, Weyant R (2003). *Francisella* and *Brucella*. In: Murray PR, ed. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 789–797.

De Carvalho I, et al. (2007). *Francisella tularensis*, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 667.

Dempsey, (2006) - Dempsey M. P., J. Nietfeldt, J. Ravel, S. Hinrichs, R. Crawford, and A. K. Benson. Paired-end sequence mapping detects extensive genomic rearrangement and translocation during divergence of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* and *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* populations. *J. Bacteriol.* 188:5904–5914.

Efimov VM, Galaktionov Y, Galaktionova TA (2003). Reconstruction and prognosis of water vole population dynamics on the basis of tularemia morbidity among Novosibirsk oblast residents. *Doklady biological sciences: Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological Sciences Section* [translated from Russian], 388:59–61.

Eigelsbach HT, Hornick RB, Tulis JJ (1967). Recent studies on live tularemia vaccine. *Medical Annals of the District of Columbia*, 36:282–286.

Farlow, J., (2005), D. M. Wagner, M. Dukerich, M. Stanley, M. Chu, K. Kubota, J. Petersen, and P. Keim. 2005. *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1835–1841.

Feldman KA et al. (2001). An outbreak of primary pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. *New England Journal of Medicine*, 345:1601–1606.

Feldman KA et al. (2003). Tularemia on Martha's Vineyard: seroprevalence and occupational risk. *Emerging Infectious Diseases*, 9:350–354.

Forsman M, Sandström G, Sjöstedt A(1994). Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:38–46.

Friend M. (2006) Tularemia, 1st ed. Reston (VA): US Geological Survey, circular 1297; 2006. <http://www.nwhc.usgs.gov/publications/tularemia>

Fulop M, Leslie D, Titball R (1996). A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54:364–366.

Garcia Del Blanco N, Dobson ME, Vela AI, De La Puente VA, Gutierrez CB, et al. (2002) Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 40: 2964–2972

Gil H, Benach JL, Thanassi DG (2004). Presence of pili on the surface of *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity*, 72:3042–3047.

Gurcan S. et al, (2008), Gurcan S. et al, Karabay O., Karadenizli A., Karagol C., Kantardjiev T., Ivanov I. N., Characteristics of the Turkish Isolates of *Francisella tularensis*, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 61, 223-225, 2008

Gurycová D., (1998). First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe, *Eur J Epidemiol.* 1998 Dec ;14(8):797-802.

Gurycova, D., E. Kocianova, V. Vyrostekova, and J. Rehacek. (1995). Prevalence of ticks infected with *Francisella tularensis* in natural foci of tularemia in western Slovakia. *Eur. J. Epidemiol.* 11:469–474.

Gyuranecz M., et al. (2012a), Miklós Gyuranecz, Dawn N. Birdsell, Wolf Splettstoesser, Erik Seibold, Stephen M. Beckstrom-Sternberg, László Makrai, László Fodor, Massimo Fabbi, Nadia Vicari, Anders Johansson, Joseph D. Busch, Amy J. Vogler, Paul Keim, David M. Wagner, Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 18, No. 2, February 2012

Gyuranecz M., et al. (2012b), Miklós Gyuranecz, Jenő Reiczigel, Katalin Krisztalovics, László Monse, Gabriella Kükedi Szabóné, Andrásné Szilágyi, Bálint Szépe, László Makrai, Tibor Magyar, Mangesh Bhide, Károly Erdélyi, Factors Influencing Emergence of Tularemia, Hungary, 1984–2010, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 18, No. 8, August 2012

Hayes E et al. (2002). Tularemia-US, 1990–2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 51: 181–184.

Higgins JA et al. (2000). Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(2):310–318.

Hopla CE (1974). The ecology of tularemia. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, 18:25–53.

Hopla CE, Hopla AK (1994). Tularemia. In: Steele GWB & Steele JH, eds. *Handbook of Zoonoses*, Boca Raton, FL, CRC Press Inc, 113–126.

Hubalek Z et al. (1997). Prevalence of *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in adjacent areas of the Czech and Austrian Republics. Central European Journal of Public Health, 5:199–201.

Gusev V., et al. (1959), Gusev V., Jmukhadze I., Bednii S., Chkheidze M., Tularemia in East Georgia, Works of Scientific-Research Anti-Plague Institute of Caucasus and South Caucasus, 1959, 2nd Edition, p.61-66 (on Russian).

Jabrailov D., (1971), Tularemia in Western Regions of Azerbaijan SSR, Candidate Dissertation Thesis, Baku, 1971 (on Russian).

Jellison WL (1950). Tularemia; geographical distribution of deerfly fever and the biting fly, *Chrysops discalis* Williston. Public Health Reports, 65:1321–1329.

Jones R. M., et al. (2005) Mark Nicas, Alan Hubbard, Matthew D. Sylvester, and Arthur Reingold, The Infectious Dose of *Francisella tularensis* (Tularemia), Applied Biosafety, 10(4) pp. 227-239 © ABSA 2005

Johansson A et al. (2000a). Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. European Journal of Clinical Microbiology, 38:22–26.

Johansson A et al. (2000b). Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. Journal of Clinical Microbiology, 38:4180–4185.

Johansson, A., (2004) J. Farlow, P. Larsson, M. Dukerich, E. Chambers, M. Bystrom, J. Fox, M. Chu, M. Forsman, A. Sjoestedt, and P. Keim. 2004. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J. Bacteriol. 186: 5808–5818.

Jusatz HJ (1952). Tularemia in Europe; 1926–1951. In: Rodenwaldt E, ed. *WeltSuchen Atlas*, Hamburg, Falk-Verlag, 7–16.

Keim, P., M. N. Van Ert, T. Pearson, A. J. Vogler, L. Y. Huynh, and D. M. Wagner. 2004. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. Infect. Genet. Evol. 4:205–213.

Keim, P., (2007) A. Johansson, and D. M. Wagner.. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1105:30–66.

Keim PS, Wagner DM (2009). Humans and evolutionary and ecological forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. Nat Rev Microbiol.;7:813–21.

Klimukhina M., et al. (1959), Klimukhina M., Eprikashvili P., Sarichev A., Tsikhistavi S., About Tularemia Outbreak in Tsiteli-Tskaro Region of East Georgia, Works of Scientific-Research Anti-Plague Institute of Caucasus and South Caucasus, 1959, 2nd Edition, p.270-276 (on Russian).

Klimukhina M., et al. (1963), Klimukhina M., Maskharashvili P., Jmukhadze I., Tsikhistavi S., Regarding Existence of Tularemia Natural Foci in Mountainous Surroundings of Tbilisi, Works of Armenian Anti-Plague Station, 1963, p.223-244 (on Russian).

Krinsky WL (1976). Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *Journal of Medical Entomology*, 13:225–275.

Kugeler KJ et al. (2006). Real-time subspecies-specific PCR for *Francisella tularensis* type A and type B. *Emerging Infectious Diseases*, 12:1799–1801.

Larsson P, Svensson K, Karlsson L, Guala D, Granberg M, et al. (2007), Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg Infect Dis* 13: 1725–1732.

Lindgren H, Honn M, Golovlev I, Kadzhaev K, Conlan W, et al. (2009) The 58-kilodalton major virulence factor of *Francisella tularensis* is required for efficient utilization of iron. *Infect Immun* 77: 4429–4436.

Nano FE et al. (2004). *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *Journal of Bacteriology*, 186:6430–6436.

Olin G (1942). Occurrence and mode of transmission of tularemia in Sweden. *Acta Microbiologica Scandinavica*, 19:220–247.

Olsufiev NG (1977). Results and perspectives of the study of natural foci of tularemia in USSR. *Meditinskaiia parazitologiiia i parazitarnye bolezni*, 46:273–282.

Olsufiev NG, Dunayeva TN (1970). Natural focality, epidemiology and prophylaxis of tularemia, Moscow, Medicina.

Parker RR et al. (1951). Contamination of natural waters and mud with *Pasteurella tularensis* and tularemia in beavers and muskrats in the northwestern US. Bulletin National Institutes of Health, 193:1–161.

Pavlovsky EN (1966). Tularemia. In: Levine ND, ed. Natural nidity of transmissible diseases. Urbana and London, University of Illinois Press, 93–128.

Petersen JM et al. (2004a). Laboratory analysis of tularemia in wild trapped, commercially distributed prairie dogs, Texas; 2002. Emerging Infectious Diseases, 10:419–425.

Pearson T, et al. (2004), Busch JD, Ravel J, Read TD, Rhoton SD, U'Ren JM, Simonson TS, Kachur SM, Leadem RR, Cardon ML, Van Ert MN, Huynh LY, Fraser CM, Keim P: Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using singlenucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101:13536-13541.

Pearson T, et al. (2009) Okinaka RT, Foster JT, Keim P: Phylogenetic understanding of clonal populations in an era of whole genome sequencing. Infect Genet Evol 2009, 9:1010-1019.

Pfahler-Jung K (1989). Die globale Verteilung der Tularemie. 1. Giessener Abhandlung zur Agrar – und Wirtschaftsforschung des Europäischen Ostens. Justus-Liebig-Universität, Giessen.

PulseNet, Selected Sections of the Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Manual, April 18, 1999

Rohmer, L., C. Fong, S. Abmayr, M. Wasnick, T. J. Larson Freeman, M. Radey, T. Guina, K. Svensson, H. S. Hayden, M. Jacobs, L. A. Gallagher, C. Manoil, R. K. Ernst, B. Drees, D. Buckley, E. Haugen, D. Bovee, Y. Zhou, J. Chang, R. Levy, R. Lim, W. Gillett, D. Guenthener, A. Kang, S. A. Shaffer, G. Taylor, J. Chen, B. Gallis, D. A. D'Argenio, M. Forsman, M. V. Olson, D. R. Goodlett, R. Kaul, S. I. Miller, and M. J. Brittnacher. 2007. Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. Genome Biol. 8:R102.

Rudnev M., et al. (1978), Rudnev M., Maskharashvili P., Magradze G., Sikharulidze M., Tsikhistavi S., Velijanashvili I., Beridze L., Tularemia Natural Foci of Steppe Type in Tskhinvali

Region of South Osetia, Especially Dangerous Infections in Caucasus, Theses of Reports, Stavropol, 1978, p.81-82 (on Russian).

Rusnak JM et al. (2004). Risk of occupationally acquired illness from biological threat agents in unvaccinated laboratory workers. *Biosecurity and bioterrorism: biodefense strategy, practice, and science*, 2(4):1–13.

Salomonsson E, Forsberg A, Roos N, Holz C, Maier B, et al. (2009) Functional analyses of pilin-like proteins from *Francisella tularensis*: complementation of type IV pilus phenotypes in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology* 155: 2546–2559.

Sjödin A, et al. (2010), Svensson K, Lindgren M, Forsman M, Larsson P, Whole-Genome Sequencing Reveals Distinct Mutational Patterns in Closely Related Laboratory and Naturally Propagated *Francisella tularensis* Strains. *PLoS ONE* 5(7): e11556.

Sjöstedt A (2005). *Francisella*. In: Garrity G et al., eds. *The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, New York, NY, Springer, 200–210.

Sjöstedt A et al. (1997). Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:1045–1048.

Staples, J. E., (2006), K. A. Kubota, L. G. Chalcraft, P. S. Mead, and J. M. Petersen.. Epidemiologic and molecular analysis of human tularemia, United States, 1964–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1113–1118.

Svensson K, Larsson P, Johansson D, Bystrom M, Forsman M, et al. (2005) Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J Bacteriol* 187: 3903–3908.

Svensson K, Granberg M, Karlsson L, Neubauerova V, Forsman M, et al. (2009) A Real-Time PCR Array for Hierarchical Identification of *Francisella* Isolates. *PLoS ONE* 4(12): e8360.

Tärnvik A, Priebe HS, Grunow R (2004). Tularemia in Europe: An epidemiological overview. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 36:350–355.

Taylor JP et al. (1991). Epidemiologic characteristics of human tularemia in the southwestcentral states, 1981–1987. *American Journal of Epidemiology*, 133:1032–1038.

Twine SM, Shen H, Kelly JF, Chen W, Sjostedt A, et al. (2006) Virulence comparison in mice of distinct isolates of type A *Francisella tularensis*. *Microb Pathog* 40: 133–138.

Velijanashvili I, (1992) Tularemia on meskhet-Javakheti plateau, Candidate Dissertation, Tbilisi, 1992, (on Russian)

Versage JL et al. (2003). Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:5492–5499.

Vodop'yanov A., et al. (2007), Vodop'yanov A. S., Mishan'kin B. N., Pavlovich N. V., and Pichurina N. L., Genotypic Heterogeneity and Geographical Diversity of Collection Strains of *Francisella tularensis* According to the Data of VNTR Analysis of Their DNA, ISSN 0891-4168, *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2007, Vol. 22, No. 2, pp. 78–86.

Vogler et al. (2009a) - Vogler, A. J., D. Birdsell, D. M. Wagner, and P. Keim. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 48:140–144.

Vogler et al. (2009b) - A. J. Vogler, D. Birdsell, L. B. Price, J. R. Bowers, S. M. Beckstrom-Sternberg, R. K. Auerbach, J. S. Beckstrom-Sternberg, A. Johansson, A. Clare, J. L. Buchhagen, J. M. Petersen, T. Pearson, J. Vaissaire, M. P. Dempsey, P. Foxall, D. M. Engelthaler, D. M. Wagner, and P. Keim. 2009, Phylogeography of *Francisella tularensis*: Global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* 191: 01786-08

Whipp MJ et al. (2003). Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *Journal of Medical Microbiology*, 52:839–842.

WHO Guidelines on Tularemia, 2007