

Р 53022.–2008 при нормальном распределении РИ должен быть рассчитан по формуле $X \pm 1,96 SD$ [7, 8].

Выводы

1. РИ агрегации тромбоцитов составили с пептидом, активирующим рецептор тромбина, 815,2–1498,4 АУ/мин, с арахидоновой кислотой – 660–1341 АУ/мин, с аденозиндифосфорной кислотой – 598–1120 АУ/мин.

2. Установленные интервалы агрегации тромбоцитов могут быть использованы в качестве референсных в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» (Астрахань), так как они разработаны с учетом всех особенностей формирования референсных групп и стандартизацией всех этапов лабораторных исследований.

3. Приведенные нами интервалы агрегации тромбоцитов могут быть использованы как референсные в лабораториях Астраханской области при работе на аналогичных аналитических системах (автоматическом агрегометре Multiplate).

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 8, 10–12 см. REFERENCES)

1. Баркаган З.С., Момот А.П. *Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза*. М.: Ньюдиамед; 2008.
2. Чарная М.А., Морозов Ю.А. Современные антиагрегантные препараты и их применение в клинике (обзор литературы). *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2009; 1: 34–40.
3. Вавилова Т.В. *Гемостазиология в клинической практике: пособие для врачей*. СПб.: Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова; 2005.
4. Долгов В.В., Свиринов В.П. *Лабораторная диагностика нарушений гемостаза*. Тверь: Триада; 2005.
5. Казакова М.С., Луговская С.А., Долгов В.В. Референсные значения показателей общего анализа крови взрослого работающего населения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 5: 43–9.
6. ГОСТ Р 53022.3–2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Правила оценки информативности лабораторных тестов. М.: ФГУП «Стандартинформ»; 2009.
7. Кишкун А.А. *Руководство по лабораторным методам диагностики*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.

Поступила 01.08.15

REFERENCES

1. Barkagan Z.S., Momot A.P. *Diagnostics and Controlled Therapy of Violations of a Hemostasis [Diagnostika i kontroliruemaya terapiya narusheniy gemostaza]*. Moscow: N'yudiamed; 2008. (in Russian)
2. Charnaya M.A., Morozov Yu.A. Modern antiagregantny preparations and their application in clinic (the review of literature). *Kardiologiya i serdechno-sosudistaya khirurgiya*. 2009; 1: 34–40. (in Russian)
3. Siller J.M., Haberl K., Prillinger K., Panzer S., Lang I., Jilma B. The effect of antiplatelet drugs clopidogrel and aspirin is less immediately after stent implantation. *Thromb. Res.* 2009; 123 (6): 874–80.
4. Vavilova T.V. *Haemostasiologiya in Clinical Practice: a Grant for Doctors. [Gemostaziologiya v klinicheskoy praktike: posobie dlya vrachey]*. St. Petersburg: Sankt-Peterburgskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet im. akad. I.P. Pavlova; 2005. (in Russian)
5. Dolgov V.V., Svirin V.P. *Laboratory Diagnostics of Violations of an Haemostasis. [Laboratornaya diagnostika narusheniy gemostaza]*. Tver': Triada; 2005. (in Russian)
6. Kazakova M.S., Lugovskaya S.A., Dolgov V.V. Reference interval of indicators of the total blood analysis of the adult working population. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 5: 43–9. (in Russian)
7. State Standard P 53022.3–2008. Technologies the laboratory clinical. Requirements to quality of clinical laboratory trials. Rules of an assessment of informational content of laboratory tests. Moscow: Federal State Unitary Enterprise Standartinform; 2009. (in Russian)
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory, Approved Guideline – Third Edition*. Wayne: CLSI; 2008: C28A3E.
9. Kishkun A.A. *Guide to Laboratory Methods of Diagnostics [Rukovodstvo po laboratornym metodam diagnostiki]*. Moscow: GEOTAR – Media; 2007. (in Russian)
10. Valarche V., Desconclois C., Boutekedjiret T., Dreyfus M., Proulle V. Multiplate whole blood impedance aggregometry: a new tool for von Willebrand disease. *J. Thromb. Haemost.* 2011; 9 (8): 1645–7.
11. Toth O., Calatzis A., Penz S., Losonczy H., Siess W. Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb. Haemost.* 2006; 96 (6): 781–8.
12. Johnson A., Dovlatova N., Heptinstall S. Multiple electrode aggregometry and P2Y (12) antagonists. *Thromb. Haemost.* 2008; 99 (6): 1127–9.

Received 01.08.15

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.9-022-078.33

Антонов В.А., Викторов Д.В.

О СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ СРЕДСТВ ИММУНОДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ. ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ *IN VIVO* И *IN VITRO*

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, Россия

В статье обсуждается ряд проблемных вопросов разработки эффективных средств иммунодиагностики инфекционных заболеваний бактериальной и микотической этиологии, связанных с подходами к выбору адекватных диагностических мишеней.

Ключевые слова: иммунодиагностика; инфекционные болезни; фазовые вариации.

Для цитирования: *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (1): 48–51.

Для корреспонденции: Антонов Валерий Алексеевич, vari2@sprint-v.com.ru

For correspondence: Antonov V.A. vari2@sprint-v.com.ru

Antonov V.A., Viktorov D.V.

ON DEVELOPMENT OF TOOLS OF IMMUNE DIAGNOSTIC OF INFECTIOUS DISEASES: PROBLEMS OF DIAGNOSTIC IN VIVO AND IN VITRO

The Volgogradskii anti-plague research institute of Rospotrebnadzor, 400131 Volgograd, Russia

The article considers a number of problematic issues concerning development of effective means of immune diagnostic of infectious diseases of bacterial and mycotic etiology related to approaches of choosing appropriate diagnostic targets.

Key words: immune diagnostic; infectious diseases; phase variations

Citation: *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61 (1): 48–51. (in Russ.)

Аналитическая достоверность определяет качество лабораторных исследований. Не касаясь вопросов интерпретации и оценок достоверности результатов диагностических тестов, в данной статье мы хотели отразить лишь один из аспектов преаналитического этапа лабораторной диагностики инфекционных заболеваний.

Выбор адекватных диагностических мишеней остается одной из ключевых проблем конструирования средств иммунодиагностики инфекционных заболеваний. В идеале, диагностический тест, направленный на выявление специфических антигенов, должен идентифицировать штаммы (изоляты) того или иного возбудителя независимо от условий их культивирования, количества генераций, индивидуальных морфологических особенностей и различий в источниках полученных проб. Что касается иммуноаналитических средств, предназначенных для определения уровня (титра) специфических антител, то и они должны обладать «видоспецифичностью» – регистрировать уровень иммунного ответа именно к определенному возбудителю и не обладать перекрестной реактивностью.

Способность генерировать структурное разнообразие поверхностных молекул является особенностью многих микробных патогенов, что, в свою очередь, способствует колонизации ими новых экологических ниш, адаптации к изменению условий окружающей среды, а также выживанию в конкурентных отношениях с другими организмами и защите от действия различных антимикробных соединений.

Общезвестны факты изменения различных фенотипических свойств, а также снижения вирулентности штаммов патогенных микроорганизмов при их длительном культивировании на искусственных питательных средах. Известен и противоположный эффект – увеличение вирулентности микробов при пассажах *in vivo*. Многими авторами показан более высокий уровень геномных и фенотипических изменений, обнаруживаемых при пассажах микроорганизмов *in vivo*, в сравнении с культивированием *in vitro* [10, 26, 31]. Технологии изучения экспрессии генов микроорганизмов в различных экологических нишах, в том числе *in vivo*, достаточно полно представлены [25]. Факторы, влияющие на дифференциальную экспрессию генов, опосредующую фазовую и антигенную вариабельность микроорганизмов, чрезвычайно разнообразны [8, 13, 14, 24, 26, 27].

Фазовыми вариациями называются обратимые переключения экспрессии поверхностных биополимеров микробной клетки (белков или полисахаридов), которые происходят с гораздо большей скоростью, чем средняя скорость мутаций в геноме. Как правило, подобные модификации сопровождаются изменениями антигенной структуры микроорганизмов (антигенные фазовые вариации), что позволяет им избегать воздействия иммунной системы организма, например, мимикрируя под его собственные антигены [31].

Считалось, что фазовые и антигенные вариации, носят случайный характер. В последнее время накопилось достаточно информации, свидетельствующей о том, что ведущая роль в контроле данных процессов принадлежит факторам внешней среды. Предположительно это более значимо для бактериальных видов с широкой экологической пластичностью и неклональной структурой популяций, например, возбудителя мелиоидоза [11, 29], однако и у высококлональных,

генетически мономорфных видов, таких как *Yersinia pestis* [5], *Burkholderia mallei* [6, 11], *Salmonella enterica serovar Typhi* [15], *Bacillus anthracis* [32], патогенных микобактерий – *Mycobacterium leprae* [19], *Mycobacterium ulcerans* [9], *Mycobacterium tuberculosis complex* [30], фазовые и антигенные вариации в значительной мере формируют адаптационный потенциал вида, а сопровождающие их изменения поверхностных клеточных структур имеют принципиальное диагностическое значение.

Весьма интересны в этом отношении фазовые изменения возбудителей особо опасных микозов, вызывающих системные инфекционные заболевания (гистоплазмоз, бластомикоз, кокцидиоидомикоз, паракокцидиоидомикоз). Эти возбудители принадлежат к группе диморфных грибов, находящихся во внешней среде в мицелиальной форме, а в организме человека и животных – в тканевой или дрожжеподобной [4]. Естественно, что антигенная структура (и соответствующие эпитопы, к которым вырабатываются специфические антитела) у данных микромицетов будет отличаться в зависимости от фазового состояния. Известно, что поверхностные биополимеры микромицетов, в том числе и возбудителей глубоких микозов, являются слабыми иммуногенами. Как следствие, антитела при соответствующих инфекциях вырабатываются в низких титрах, а детекция их уровня имеет диагностическое значение лишь вне эндемических регионов. Методы серодиагностики глубоких микозов, основанные на обнаружении антигенов, в ряде случаев могут быть более информативными, чем методы, использующие обнаружение антител. Наличие общих антигенов у различных таксономических групп микромицетов также определяет сложность серологической диагностики микозов. Ложноположительные результаты серологических реакций возможны при миконосительстве и у здоровых людей, сенсибилизированных антигенами грибов, тогда как отрицательные результаты тестов могут наблюдаться у иммунодефицитных больных даже на фоне протекающего инвазивного микоза [3, 4, 16, 23].

Относительно низкая чувствительность и специфичность стандартно используемых в диагностике опасных микозов иммунодиагностических тестов обусловлена и комплексом причин технологического характера – в большинстве случаев разработанные диагностические средства основаны на использовании антигенных комплексов ультразвуковых дезинтеграторов клеток, либо частично очищенных антигенов мицелиальной фазы [16]. По этой причине в настоящее время многие исследователи сконцентрировали свое внимание на получении иммунодоминантных антигенов паразитарной фазы (тканевых или дрожжеподобных форм) данных микромицетов с целью создания иммунодиагностических препаратов [3, 4].

Аналогичные проблемы наблюдаются и в области разработки средств серологической диагностики инфекций, вызываемых бактериями. У многих грамотрицательных микроорганизмов, для которых основным специфическим антигеном является липополисахарид (ЛПС), антигенные фазовые вариации затрагивают в первую очередь именно этот бактериальный биополимер.

Сравнительное изучение специфичности антител в сыворотках крови людей после туляремийной инфекции и иммунизации живой туляремийной вакциной продемонстрировало,

что сыворотки больных ей содержат иммуноглобулины, специфичные как антигенным эпитопам ЛПС *F. tularensis*, так и эпитопам ЛПС *F. tularensis subsp. novicida*, что обусловлено фазовыми вариациями антигенной структуры ЛПС туляремийного микроба в организме относительно резистентных хозяев и появлением в структуре ЛПС *F. tularensis* антигенных эпитопов, характерных для ЛПС слабопатогенного подвида [1, 2]. Именно живые микробы *F. tularensis* и *F. novicida-like* вызывают в организме более выраженный ЛПС-специфический антительный ответ, тогда как инактивированные клетки франциселл индуцируют *in vivo* образование анти-ЛПС-иммуноглобулинов в 8–16 раз меньших титрах [1]. На сегодняшний день идентифицированы гены туляремийного микроба (*flmF2* и *flmK*), ответственные за модификации липидной части ЛПС при фазовых вариациях. Снижение уровня экспрессии данных детерминант при длительном культивировании *in vitro* может приводить к образованию вариантов *F. tularensis* со сниженной иммуногенностью ЛПС [28].

Происходящие в процессе внутриклеточного паразитирования фазовые вариации *L. pneumophila* сопровождаются антигенными изменениями, вызываемыми структурными модификациями ЛПС [18]. N-метилование антигенных эпитопов липополисахарида легионелл в процессе фазовой изменчивости существенным образом сказывается на эффективности детекции клеток возбудителя с использованием ЛПС-специфичных моноклональных антител [2].

Локус *vlsE Borrelia burgdorferi*, кодирующий липопротеин – основной иммуноген клеточной поверхности возбудителя Лайм-боррелиоза, является другим примером системы детерминации фазовой антигенной вариабельности [22]. Многочисленные рекомбинационные события между активным локусом *vlsE* и его нефункциональными копиями, наблюдающиеся в ходе инфекционного процесса, приводят к генерации новых аллелей гена и, как следствие, продукции поверхностного липопротеина с измененной эпитопной структурой, тогда как при культивировании *in vitro* рекомбинационная активность *vlsE* практически не регистрируется. Безуспешными оказались попытки индуцировать рекомбинацию *vlsE* гена у боррелий *ex vivo*, также не удалось обнаружить фазовые антигенные вариации боррелий при культивировании *in vitro* в течение 28–84 дней, при разведении в организме переносчиков инфекции и при трансплантации возбудителя в камеры для диализа в организм хозяина [33].

При создании иммунодиагностических препаратов ориентируются на два критерия – специфичность и чувствительность. При этом чувствительность современных иммунодиагностических тест-систем начинается от концентрации 10^4 микробных клеток на 1 мл (м.к./мл). В различных инструкциях по их применению приводятся несколько более высокие цифры, вплоть до 10^2 м.к./мл, однако в лабораторной практике такие цифры попадают или в пограничные значения, или не встречаются вовсе, т. е. полученные результаты не соответствуют заявленным в технической документации производителя. Если специфичность – качественный показатель диагностической тест-системы, отражающей особенность в отношении рода, вида, штамма, клона микроорганизма, то чувствительность – ее количественная характеристика, которая прежде всего зависит от количества специфических антигенных эпитопов, выявляемых антителами в анализируемой пробе.

Некоторый положительный эффект в отношении повышения чувствительности иммунодиагностического теста может дать предварительная дезинтеграция анализируемого материала. При использовании моноклональных антител, направленных на выявление ЛПС *B. mallei*, более эффективно выявлялись лизированные клетки возбудителя сапа в сравнении с интактными, не исключено, что данный эффект обусловлен «деэкранизацией» специфических эпитопов ЛПС при лизисе клеток [34].

Более многообещающей в плане повышения чувстви-

тельности и специфичности, на наш взгляд, является стратегия разработки средств иммунодиагностики, основанная на выборе в качестве диагностических мишеней биополимеров микроорганизма, экспрессирующихся в ходе инфекционного процесса.

Анализ эффективности различных иммунодиагностических тест-систем для обнаружения *B. pseudomallei* и *B. mallei*, проводимый специалистами Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза на базе ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, демонстрирует, например, что чувствительность препаратов для выявления патогенных буркхольдерий методом флуоресцирующих антител увеличивается после пассажа исследуемых бактериальных культур *in vivo*.

Технологии направленного выбора потенциальных кандидатных биополимеров бактериальных клеток для создания иммунодиагностических систем и конструирования компонентных средств иммунопрофилактики в настоящее время с успехом развиваются применительно к ряду бактерий. Следует упомянуть работы по идентификации протективных, иммунодоминантных поверхностных белков *Neisseria meningitidis* и ряда других патогенных грамотрицательных бактерий [7, 20]. Эти современные методологии скрининга потенциальных диагностических мишеней включают в себя этапы биоинформационного *in silico* поиска биополимеров требуемой специфичности, их экспериментальной верификации методами транскриптомики и протеомики, клонирования их кодирующих последовательностей и получения рекомбинантных продуктов, удобных для быстрого и безопасного накопления целевых биомолекул-мишеней высокой степени очистки. Исследования такого рода стали возможны лишь при условии наличия достаточных сведений о генетической структуре того или иного вида бактерий и данных секвенирования его генома.

Анализ дифференциально экспрессирующихся последовательностей геномов патогенных микроорганизмов в условиях культивирования на искусственных питательных средах и при паразитировании в организме хозяина также является эффективным инструментом скрининга потенциальных диагностических мишеней. Например, при анализе экспрессии генов *B. mallei* выявлены группы генов с пониженной и повышенной экспрессией *in vivo*. Гены с повышенной экспрессией *in vivo* (более 300) детерминировали функции инфицирования и выживания в хозяине (усвоения и транспорта железа, резистентности к токсинам, анаэробного дыхания, капсулообразования, гемолиза, секреторного аппарата III типа и ряд других) [17].

Не менее эффективен методологический подход, основанный на технологии *InMAD* (*In vivo Microbial Antigen Discovery*) – генерации библиотек антител к бактериальным антигенам, обнаруживаемым в сыворотке крови инфицированных животных. С использованием данного подхода идентифицированы многочисленные видоспецифические антигены *B. pseudomallei* и *F. tularensis* (протеины, капсульные полисахариды, липополисахариды) [21].

По нашему мнению, необходимость изменения алгоритмов создания иммунодиагностических препаратов для выявления микроорганизмов в пробах клинического материала (антительные диагностикумы) или маркеров инфекции (антигенные диагностикумы) вполне очевидна и определяется существенными количественными и качественными различиями в экспрессии антигенов многими патогенами *in vivo* и *in vitro*. Логично предположить, что использование в качестве диагностических мишеней биополимеров микроорганизмов, преимущественно экспрессирующихся *in vivo*, в ходе инфекционного процесса позволит существенным образом увеличить чувствительность иммунодиагностических средств, направленных на выявление возбудителей (либо специфических антител) в клиническом материале.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5–34 с.м. REFERENCES)

1. Аронова Н.В., Павлович Н.В. Фазовые вариации липополисахарида *Francisella tularensis* при инфекции и иммунизации человека. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии*. 2005; 4: 8–12.
2. Книрель Ю.А. Российско-немецкий семинар по липополисахаридам бактериальных патогенов человека. *Вестник Российского фонда фундаментальных исследований*. 2003; 1: 1–6.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство*. М.: Шико; 2009.
4. Малеев В.В., ред. *Особо опасные микозы*. Волгоград: Волга-Паблицер; 2013.

Поступила 20.11.15

REFERENCES

1. Aronova N.V., Pavlovich N.V. Phase variation LPS *Francisella tularensis* infection and immunization with the man. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2005; 4: 8–12. (in Russian)
2. Knirel' Yu.A. Russian-German workshop on lipopolysaccharide bacterial human pathogens. *Vestnik Rossiyskogo fonda fundamental'nykh issledovaniy*. 2003; 1: 1–6. (in Russian)
3. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., eds. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: A Practical Guide. [Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney: Prakticheskoe rukovodstvo]*. Moscow: Shiko; 2009. (in Russian)
4. Maleev V.V., ed. *Particularly Dangerous Fungal Infections. [Osobo opasnye mikozy]*. Volgograd: Volga-Publisher; 2013. (in Russian)
5. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96 (24): 14 043–8.
6. Antonov V., Tkachenko G., Altukhova V., Savchenko S., Zinchenko O., Viktorov D. et al. Molecular identification and typing of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: when is enough enough? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102 (Suppl. 1): S134–9.
7. Davies M.N., Flower D.R. Harnessing bioinformatics to discover new vaccines. *Drug Discov. Today*. 2007; 12 (9–10): 389–95.
8. Deitsch K., Lukehart S., Stringer J. Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 493–503.
9. Demangel C., Stinear T., Cole S. Buruli ulcer: reductive evolution enhances pathogenicity of *Mycobacterium ulcerans*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 50–60.
10. Forche A., Magee P., Selmecki A., Berman J., May G. Evolution in *Candida albicans* populations during a single passage through a mouse host. *Genetics*. 2009; 182 (3): 799–811.
11. Godoy D., Randle G., Simpson A.J., Aanensen D.M., Pitt T.L., Kinoshita R. et al. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41 (5): 2068–79.
12. Harrison O.B., Robertson B.D., Faust S.N., Jepson M.A., Goldin R.D., Levin M. et al. Analysis of pathogen-host cell interactions in purpura fulminans: expression of capsule, type IV pili, and PorA by *Neisseria meningitidis* in vivo. *Infect. Immun.* 2002; 70 (9): 5193–201.
13. Hayden H., Lim R., Brittnacher M., Sims E., Ramage E., Fong C. et al. Evolution of *Burkholderia pseudomallei* in recurrent melioidosis. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e36507.
14. Hogardt M., Heesemann J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010; 300 (8): 557–62.
15. Holt K.E., Parkhill J., Mazzoni C.J., Roumagnac P., Weill F.X., Goodhead I. et al. Highthroughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella Typhi*. *Nat. Genet.* 2008; 40 (8): 987–93.
16. Huppert M., Adler J.P., Rice E.N., Sun S.N. Common antigens among systemic disease fungi analyzed by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Infect. Immun.* 1979; 23 (2): 479–85.
17. Kim H.S., Schell M.A., Yu Y., Ulrich R.L., Sarria S.H., Nierman W.C. et al. Bacterial genome adaptation to niches: divergence of the potential virulence genes in three *Burkholderia* species of different survival strategies. *BMC Genomics*. 2005; 6: 174.
18. Lüneberg E., Zähringer U., Knirel Y., Steinmann D., Hartmann M., Steinmetz I. et al. Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* 1998; 188 (1): 49–60.
19. Monot M., Honore N., Garnier T., Araoz R., Coppee J.Y., Lacroix C. et al. On the origin of leprosy. *Science*. 2005; 308 (5724): 1040–2.
20. Mora M., Donati C., Medini D., Covacci A., Rappuoli R. Microbial genomes and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology approach. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006; 9: 532–6.
21. Nuti D.E., Crump R.B., Handayani F., Chantratita N., Peacock S.J., Bowen R. et al. Identification of circulating bacterial antigens by in vivo microbial antigen discovery. *MBio*. 2011; 2 (4): e00136–11.
22. Ohnishi J., Schneider B., Messer W., Piesman J., de Silva A. M. Genetic variation at the *vlsE* locus of *Borrelia burgdorferi* within ticks and mice over the course of a single transmission cycle. *J. Bacteriol.* 2003; 185 (15): 4432–41.
23. Pappagianis D. Serologic studies in coccidioidomycosis. *Semin. Respir. Infect.* 2001; 16 (4): 242–50.
24. Hornstra H., Limmathurotsakul D., Max T., Sarovich D., Vogler A. et al. Within-host evolution of *Burkholderia pseudomallei* in four cases of acute melioidosis. *PLoS Pathog.* 2010; 6 (1): e1000725.
25. Rediers H., Rainey P.B., Vanderleyden J., De Mot R. Unraveling the secret lives of bacteria: use of in vivo expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005; 69 (2): 217–61.
26. Romero C., Deshazer D., Feldblyum T., Ravel J., Woods D., Kim H. et al. Genome sequence alterations detected upon passage of *Burkholderia mallei* ATCC 23344 in culture and in mammalian hosts. *BMC Genomics*. 2006; 7: 228.
27. Smith E., Buckley D., Wu Z., Saenphimmachak C., Hoffman L., D'Argenio D. et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103 (22): 8487–92.
28. Soni S., Ernst R.K., Muszynski A., Mohapatra N.P., Perry M.B., Vinogradov E. et al. *Francisella tularensis* blue-gray phase variation involves structural modifications of lipopolysaccharide O-antigen, core and lipid A and affects intramacrophage survival and vaccine efficacy. *Front. Microbiol.* 2010; 1: 129.
29. Spratt B.G. Exploring the concept of clonality in bacteria. *Methods Mol. Biol.* 2004; 266: 323–52.
30. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K.E., Connell N.D., Kreiswirth B.N., Whittam T.S. et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94 (18): 9869–74.
31. Van der Woude M.W., Baumler A.J. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17 (3): 581–611.
32. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J. et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS ONE*. 2007; 2 (5): e461.
33. Zhang J.R., Norris S.J. Kinetics and in vivo induction of genetic variation of *vlsE* in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 1998; 66 (8): 3689–97.
34. Zhang S., Feng S.H., Li B., Kim H.Y., Rodriguez J., Tsai S. et al. In Vitro and In Vivo studies of monoclonal antibodies with prominent bactericidal activity against *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011; 18 (5): 825–34.

Received 20.11.15