

Современные Эпизоотолого-эпидемические аспекты туляремии в Российской Федерации

Павлов В. М.

Государственный научный центр
прикладной микробиологии и
биотехнологии, Оболенск

Туляремия – зоонозная природно-очаговая особо опасная инфекция

Возбудитель туляремии - бактерии *F. tularensis* инфицирует более 200 видов животных и передается человеку - прямым контактом с зараженным животным, приёмом внутрь контаминированной воды и пищи, аэрогенным путем, а также через укусы клещей, мух и комаров.

- На территории Российской Федерации постоянно существуют эндемичные по туляремии регионы, в которых возможно заражение людей.
- Природные очаги туляремийной инфекции характеризуются своей стойкостью и способностью, при формировании благоприятных условий, накапливать инфекционный материал, тем самым создавая потенциальную угрозу для населения, проживающего в эндемичных районах.

- В данных регионах важно следить за эволюцией возбудителя туляремии, связанной с изменением условий окружающей среды, из-за возможного усиления патогенных свойств *Francisella tularensis*, которые могут привести к появлению штаммов с повышенной инфекционностью для человека.

- До настоящего времени остается актуальной проблемой количественной оценки патогенности возбудителя туляремии циркулирующего в очаге. Как правило, все природные изоляты *F. tularensis* обладают высокой вирулентностью для лабораторных мышей и поэтому не могут быть дифференцированы по степени патогенности с использованием мышинной модели туляремии.

- В ГНЦ ПМБ была проведена работа по получению авирулентного штамма *F. tularensis*3m лишённого продукта гена *iglC*. Этот штамм позволяет формировать у линейных мышей дозозависимый иммунитет к различным подвидам туляремийного микроба

Анализ уровня патогенности различных подвигов *F. tularensis*

Подвид, штамм		ЕД50 для штамма <i>F. tularensis</i> 3m
Subsp. <i>holarctica</i> , 503		1×10^3
Subsp. <i>holarctica</i> , A-1054		3×10^4
Subsp. <i>tularensis</i> , Schu		2×10^5
Subsp. <i>tularensis</i> , B339(Acole)		2×10^6
Subsp. <i>mediasiatica</i> , 120		3×10^5
Subsp. <i>mediasiatica</i> , A-678		8×10^5
Subsp. <i>mediasiatica</i> , A-823		3×10^5
Subsp. <i>mediasiatica</i> , A-554		2×10^5

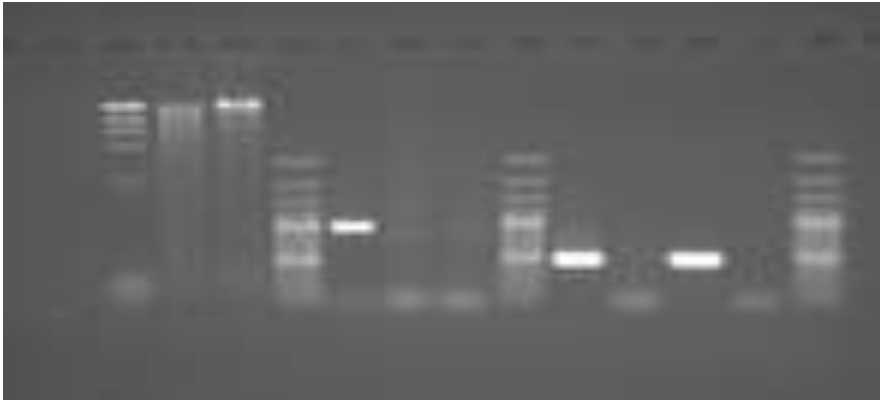
- Полученные данные позволяют предложить данную модель для оценки патогенности выделяемых штаммов с целью расширения информативности паспортов штаммов возбудителей циркулирующих в различных очагах туляреминой инфекции РФ.

- Основой для научного прогноза потенциальных вспышек и эпидемий туляремии является выявление участков стойкого сохранения возбудителя или ядер природных очагов, а также участков выноса инфекции и участков всегда или почти всегда свободных от возбудителя.

- Плановый отлов мелких грызунов позволяет с одной стороны определять плотность расселения грызунов и ее динамику на исследуемой территории.
- А анализ сывороток из отловленных грызунов - на наличие специфических антител и анализ селезенок на наличие ДНК возбудителя туляремии позволяет выявлять ядро очага и направления выноса возбудителя на прилегающие территории

- В настоящее время проблем с определением специфических антител в исследуемых сыворотках нет.
- Проблемой является выявление ДНК возбудителя туляремии в селезенках отловленных животных.

- Нами была проведена работа по выяснению возможности для этих целей ПЦР с использованием двух пар праймеров: одна пара комплементарна участкам фрагментов хромосомы *F. tularensis* фланкирующих ген *iglC*. Получаемый ампликон с этими праймерами имеет размер 1000 н.п.
- Другая пара комплементарна внутренним областям гена *iglC*. Получаемый ампликон с этими праймерами имеет размер 400 н.п.

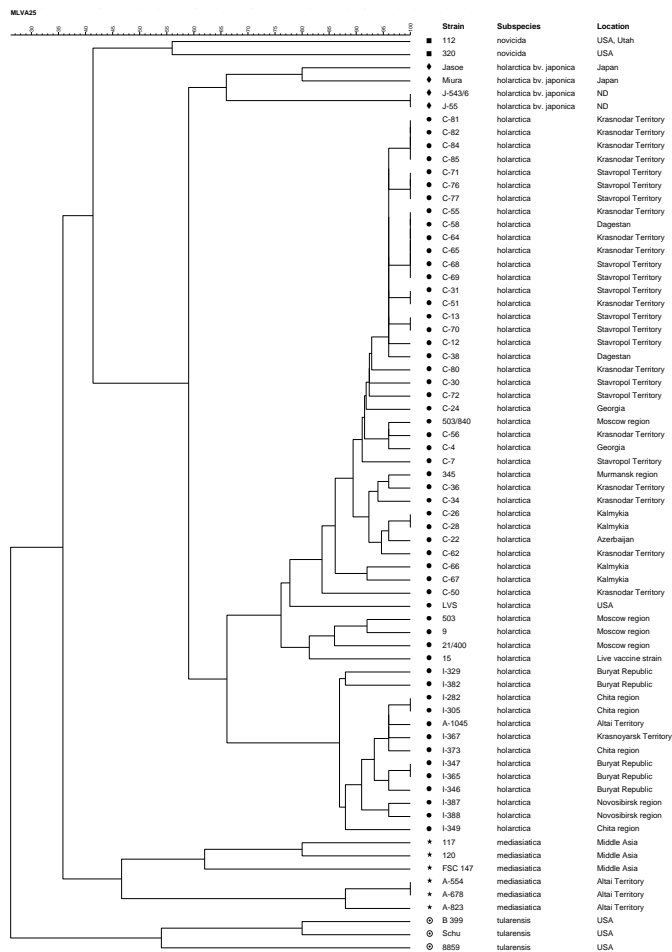
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	
		
	<p>Дорожки -1,4,8 и13 –маркеры молекулярных весов фрагментов ДНК</p> <p>5 и 6 - ампликоны с контрольной ДНК <i>F. tularensis</i> 503 с первой парой и второй, соответственно</p> <p>2 и 3 –препараты ДНК из селезенок мышей</p> <p>6,7 и 10,11- ампликоны с анализируемых ДНК</p> <p>12 – контроль растворов</p>	

- Предлагаемые праймеры можно использовать и в системе ПЦР реального времени. В этом случае первый этап проводится с фланкирующими праймерами в течение 40 циклов – до появления достоверного сигнала. Второй этап с внутренними праймерами позволяет выявлять образцы с геном *iglC F. tularensis* через 5 – 6 циклов ПЦР

- Учитывая уникальность гена *iglC* для вида *F. tularensis* предлагаемый метод позволяет выявлять ДНК возбудителя туляремии не только в образцах селезенок отловленных грызунов, но и в инфицированных клещах.

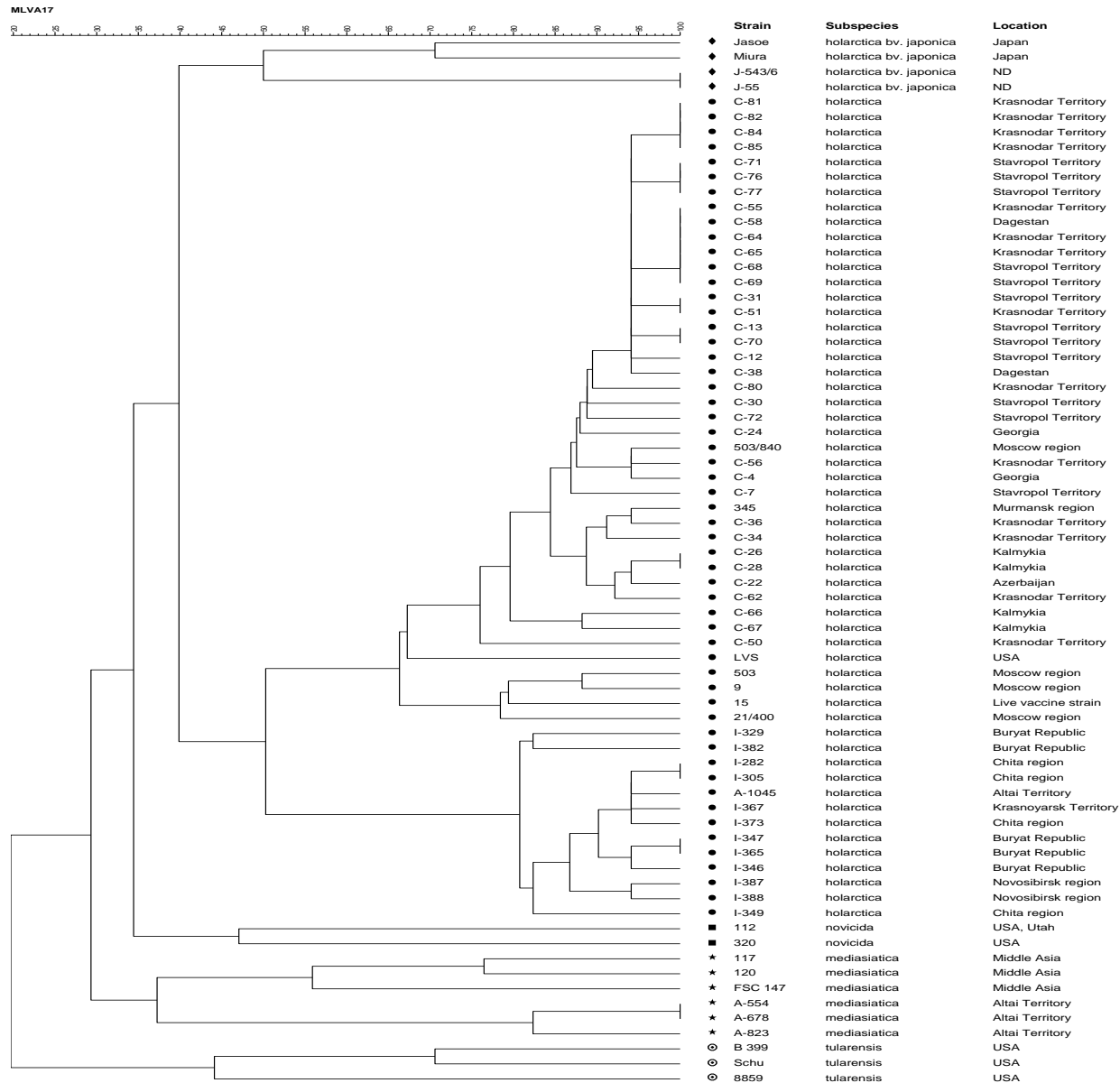
- На базе ФБУН ГНЦ ПМБ был создан референс-центр по туляремии в Российской Федерации. В результате сотрудничества с региональными центрами мы провели серию исследований, которые, на наш взгляд, были полезны для практического использования.

Кластеризация штаммов *F. tularensis* методом UPGMA по 25 локусам



- Информативность и значимость использованных для построения филогенетического дерева 25 локусов не одинакова. Количество повторов в 8 локусах - Ft-M1, Ft-M9, Ft-M11, Ft-M14, Ft-M15, Ft-M16, Ft-M19, Ft-M23 - неизменно для всех исследованных в данной работе голарктических штаммов и их использование не дает никакой информации о вариабельности штаммов внутри этого подвида. На избыточность использования 25 локусов указывает тот факт, что дендрограмма, построенная по оставшимся 17 локусам, практически идентична таковой, построенной по данным 25 локусов .

Кластеризация штаммов *F. tularensis* по 17 локусам



- Количество повторов в гипервариабельном локусе Ft-M3 изменяется от штамма к штамму в пределах от 3 до 63, что позволяет с его помощью различать штаммы, выделенные из одного географического района.
- .

Количество повторов в гипервариабельном локусе Ft-M3 в геномах штаммов подвида *holarctica*, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока

Номер штамма <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	Место выделения штамма	Количество повторов в локусе Ft-M3
I-282	Читинская область	9
I-305	Читинская область	9
I-329	Республика Бурятия	21
I-346	Республика Бурятия	11
I-347	Республика Бурятия	11
I-349	Читинская область	13
I-365	Республика Бурятия	11
I-367	Красноярский край	27
I-373	Читинская область	14
I-382	Республика Бурятия	15
I-387	Новосибирская область	7
I-388	Новосибирская область	21

- Анализ штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* как по 25, так и по 17 локусам позволил выявить корреляцию между генетическими группами и регионами выделения штаммов Эти группы можно условно назвать «московская», «ставропольская» и «иркутская», причем к последней принадлежит и изолят А-1045, выделенный в Алтайском крае.

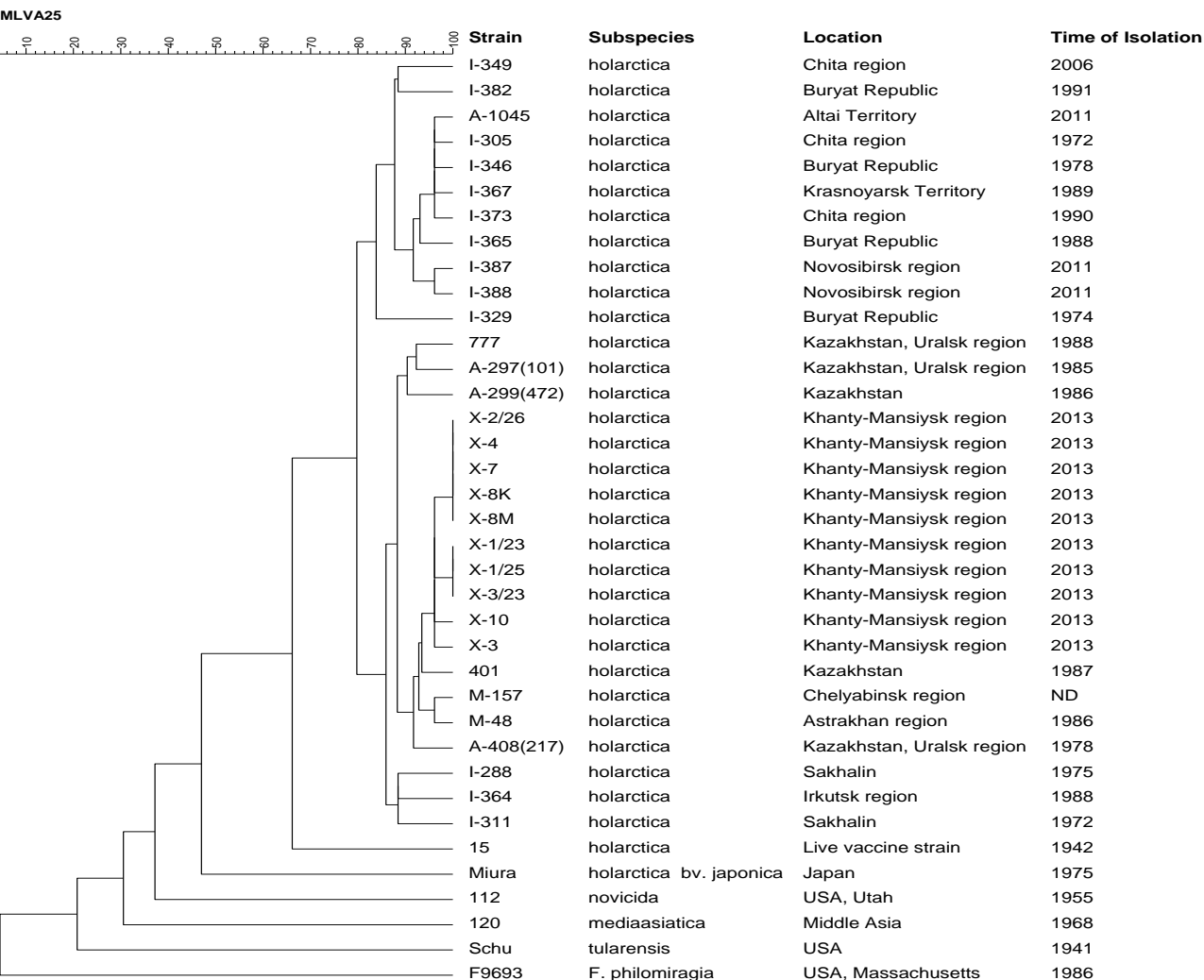
- Штаммы «московской» группы отличаются от штаммов из других групп тремя повторами в локусах Ft-M17 и Ft-M18. Штаммы «ставропольской» группы характеризуются двумя повторами в Ft-M17 локусе. Отличия штаммов из «иркутской» группы более значительны и включают по одному повтору Ft-M2, Ft-M8 и Ft-M17, по два повтора Ft-M21, по три повтора Ft-M6 и Ft-M22, при этом штаммы, выделенные на территории Новосибирской области, образуют отдельную подгруппу, так как в геноме имеют по пять повторов в локусе Ft-M22.

- В Алтайском крае обнаружены очаги с генетически обособленной популяцией *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, ареал распространения которой территориально перекрывается с западной частью ареала распространения сибирских штаммов голарктической расы туляремийного микроба.

- Штаммы А-554, А-678 и А-823 относятся к среднеазиатскому подвиду. При этом штаммы А-554 и А-678 являются генетически идентичными по 25 VNTR локусам, а штамм А-823 отличается от них по количеству повторов в трех локусах (Ft-M3, Ft-M7 и Ft-M20),

- В августе-сентябре 2013 года в г. Ханты-Мансийске была зафиксирована крупная вспышка туляремии у людей.
- Для филогенетического анализа возбудителя туляремии, вызвавшего эпидемию среди жителей г. Ханты-Мансийска в августе-сентябре 2013 года, были выделены шесть культур туляремийного микроба от больных и четыре – от мелких грызунов, отловленных в городе и его окрестностях.
- Все выделенные штаммы *F. tularensis* относятся к голарктическому подвиду, высоковирулентны для лабораторных мышей, устойчивы к эритромицину, ампициллину и цефалоспорином, но чувствительны к амикацину, тетрациклину, доксициклину и гентамицину. Методом MLVA по 25 локусам показано, что исследованные штаммы располагаются одним кластером на филогенетическом дереве, вместе со штаммами *F. tularensis*, выделенными ранее на территории Южного Урала и Казахстана.
- Все штаммы из очага являются близкородственными и, по данным анализа гипервариабельного локуса Ft-M3, подразделяются на четыре группы. Штаммы, выделенные из людей, образуют три группы, а штаммы, выделенные из мелких грызунов - две, причем в одну из групп Ханты-Мансийского кластера попали штаммы, выделенные как из людей, так и из грызунов.

Филогенетическое родство штаммов *F. tularensis*, выделенных в г. Ханты-Мансийске, со штаммами из близлежащих очагов туляремии.

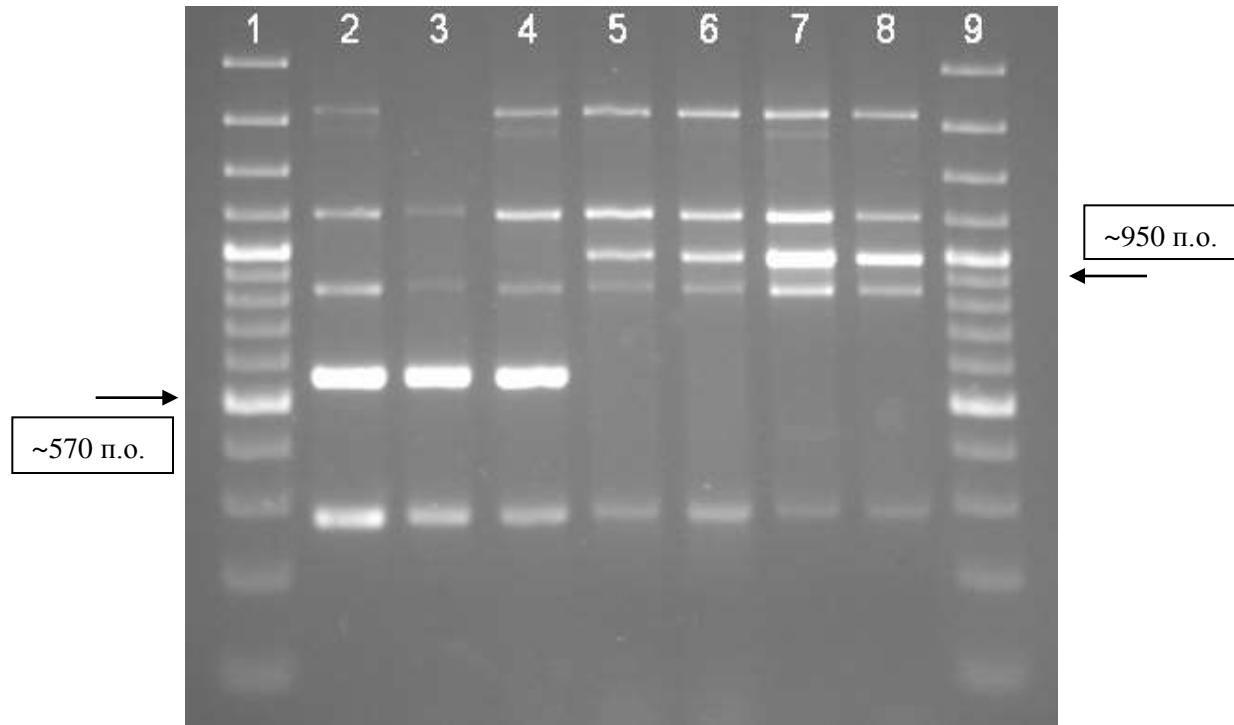


№	Штамм	Количество повторов в локусе Ft-МЗ
1	3	9
2	10	10
3	4	15
4	7	15
5	8К	15
6	8М	15
7	2/26	15
8	1/23	17
9	3/23	17
10	1/25	17

- Таким образом, все выделенные штаммы в г. Ханты-Мансийске относятся к голарктическому подвиду и являются близкородственными, отличаясь друг от друга по гипервариабельному локусу Ft-M3.
- Предыдущая крупная вспышка туляремии в Югре была зафиксирована в начале 1980-х годов, во время которой заболело несколько тысяч человек. Однако тогда культуры возбудителя туляремии от людей не были выделены, что не позволяет сравнивать генотип культур, выделенных в 2013 г. с возбудителем, вызвавшим эпидемию более 30 лет тому назад.

Электрофореграмма ампликонов, полученных ПЦР с праймером Chi1f и ДНК *F. tularensis*:

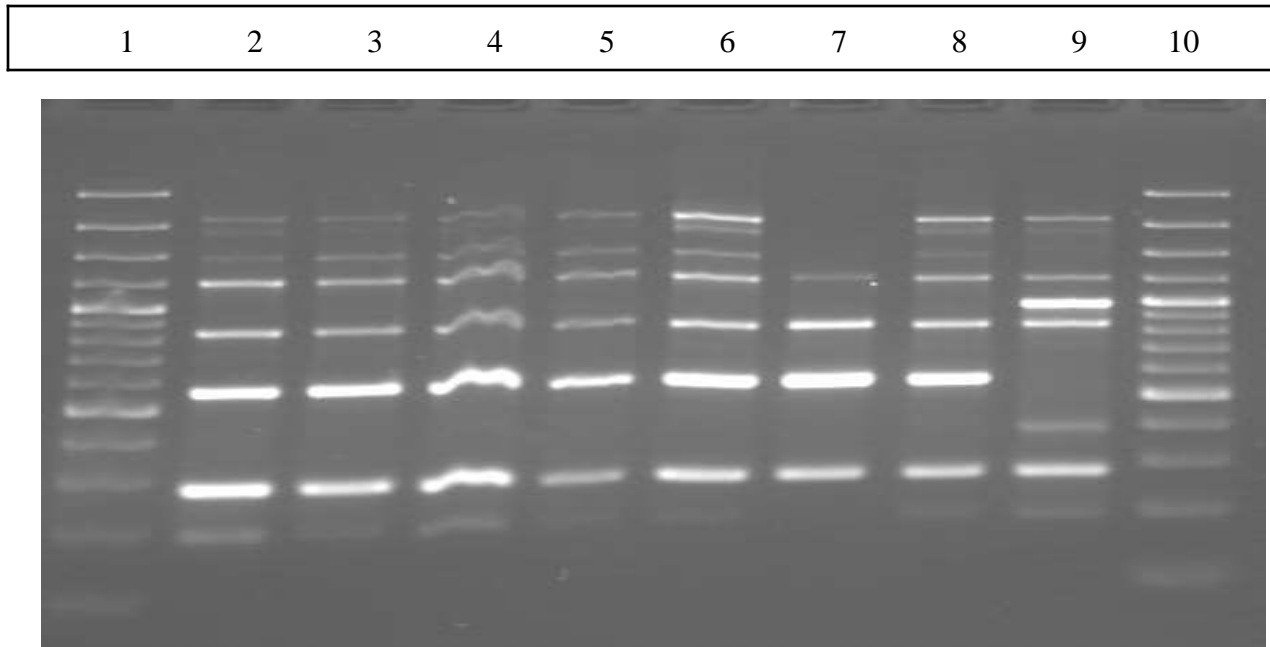
1,9 – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; 2 – subsp. *holarctica* 15; 3 – subsp. *holarctica* 503; 4 – A-1045; 5 – A-554; 6 – A-678; 7 – A-823; 8 – subsp. *mediasiatica* 120



Электрофореграмма ампликонов, полученных с праймером Chi1f и ДНК:

2 - *F. tularensis* subsp. *holarctica* 1045; 3 - *F. tularensis* X-3; 4 - *F. tularensis* X-4; 5- *F. tularensis* X-7; 6- *F. tularensis* X-8K; 7 - *F. tularensis* X-8M; 8- *F. tularensis* X-10; 9- *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 678. В

дорожках 1 и 10 - маркер молекулярных масс.



Выводы

- На территории Российской Федерации циркулируют штаммы как голарктического, так и среднеазиатского подвидов.
- Предложен метод оценки патогенности возбудителей циркулирующих в различных очагах туляремийной инфекции РФ.
- Использование методов ИФА и ПЦР при анализе отловленных грызунов позволяет получать объективные данные для оконтуривания очагов туляремийной инфекции и прогнозирования эпизоотической напряженности в очагах.

- *Спасибо за внимание!*