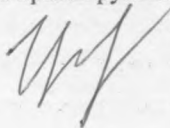


На правах рукописи



Цыганкова Елена Анатольевна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКОГО ПОДХОДА
К ГЕНЕТИЧЕСКОМУ ТИПИРОВАНИЮ
ШТАММОВ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА**

03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов 2007

Работа выполнена в ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Еременко Евгений Иванович

Официальные оппненты: доктор биологических наук, профессор
Попов Юрий Алексеевич

доктор медицинских наук, профессор
Липницкий Анатолий Васильевич

Ведущая организация: ФГУ «48 Центральный НИИ Министерства обороны Российской Федерации» (г. Киров)

Защита состоится « 7 » ноября 2007 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационноо совета Д.208.078.01 по присуждению ученой степени доктора (кандидата) наук при ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Автореферат разослан « 6 » октября 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник



А.А. Слудский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Сибирская язва в настоящее время продолжает оставаться проблемой для здравоохранения и ветеринарии. Даже в высокоразвитых странах случаются разлитые эпизоотии этой инфекции. Примером может служить небывалая по масштабам эпизоотия сибирской язвы сельскохозяйственных и диких травоядных животных на сопредельных территориях США и Канады летом и осенью 2006 года, в ходе которой заболел один человек (Nishi J. S. et al., 2007). Вспышки заболеваемости людей связаны с эпизоотиями и носят спорадический характер. Тем не менее, они всегда сопряжены с проведением большого объема диагностических, терапевтических, противоэпидемических, профилактических мероприятий. Проблема сибирской язвы вряд ли будет окончательно решена в связи с существованием стационарно-неблагополучных пунктов, сопряженных с почвенными очагами инфекции, сохраняющимися неопределенно долго. Только на территории Российской Федерации таких пунктов зарегистрировано более 35 тысяч (Черкасский Б.Л., 1969; Онищенко Г.Г. с соавт., 1999; Черкасский Б.Л., 2002). Чрезвычайная устойчивость спор *Bacillus anthracis*, выживающих во внешней среде десятилетиями без утраты вирулентности, обеспечивает потенциал новых эпизоотий, возможность распространения возбудителя за пределы эпизоотического очага с инфицированными продуктами животноводства и заболевания людей. Возросшая в современных условиях мобильность населения и расширяющиеся торгово-экономические связи определяют повышенный риск завоза возбудителя из неблагополучных областей с импортируемыми продуктами.

В последние годы заявил о себе новый аспект проблемы – использование возбудителя сибирской язвы в качестве средства биологического терроризма (Черкасский Б.Л., 2004; Frischknecht F. et al., 2003). Вдыхание спор сибиреязвенного микроба в таких случаях, как и при военном применении, ведет к развитию у жертв ингаляционной формы инфекции, отличающейся тяжелым течением и частыми фатальными исходами.

Весьма важным вопросом, который в числе прочих необходимо решать всякий раз при возникновении вспышек сибирской язвы как природного характера, так и вызванных преднамеренным использованием спор *B. anthracis* в качестве поражающего агента, является вопрос о происхождении и путях распространения возбудителя. Неоценимым для его практического решения становится подход, основанный на генетическом типировании возбудителя. В частности, при расследовании вспышки сибирской язвы вследствие террористического акта в США в 2001 году были использованы разработанные там же методы многолокусного анализа областей генома с переменным числом tandemных повторов (MLVA) (Keim P. et al., 2000) и секвенирования гена протективного антигена (ПА) (Price L. et al., 1999; Hoffmaster A. et al., 2002). Эти методы позволили проследить связи случаев инфекции между собой и местом заражения, а также отличить культуры, не относящиеся к этой вспышке. Однако выявить генетическую переменность штаммов, выделен-

ных в ходе одной вспышки, а также у вариантов одного и того же штамма дал возможность только полный сиквенс геномов (Read T. et al., 2002).

В связи с этим особую важность приобретает не только совершенствование методов и средств диагностики, профилактики и лечения, но и разработка точных и эффективных методов генетического типирования возбудителя для определения источника происхождения штаммов *B.anthraxis*, вызвавших вспышку сибирской язвы или использованных при террористическом акте. В настоящее время наиболее распространен метод молекулярного типирования штаммов *B.anthraxis*, основанный на анализе нескольких хромосомных и плазмидных локусов с варибельным числом tandemных повторов (VNTR- локусов), называемый MLVA (Keim P. et al., 2000; Le Fleche P. et al., 2001). MLVA в сочетании с филогенетическим анализом обнаружил закономерное географическое распределение генотипов штаммов сибиреязвенного микроба и различия в степени генетического родства между ними (Еременко Е.И. и др., 2000; Keim P. et al., 2000; Fasanella A. et al., 2001; Le Fleche P. et al., 2001; Wang B. et al., 2001; Maho A. et al., 2006). Необходимо отметить, что MLVA в оригинальном варианте и тем более секвенационное типирование требует дорогостоящего оборудования и реактивов, которыми в настоящее время в Российской Федерации располагает очень ограниченный круг ведущих научно-исследовательских учреждений. У нас в стране предложена более доступная модификация MLVA, с использованием которой оценена генетическая варибельность штаммов *B.anthraxis*, выделенных в СНГ (Еременко Е.И. и др., 2000; Цыганкова О.И. и др., 2003). Кроме того, в качестве дополнительных генетических маркеров при определении степени генетического родства штаммов используют предложенное L. Price et al. (1999) определение генотипа гена ПА в соответствии с полиморфизмом единичных нуклеотидов (SNP). Несмотря на высокую разрешающую способность данных систем генотипирования, они не способны различать штаммы, произошедшие из одного источника и имеющие одинаковый MLVA- и ПА-генотипы. Метод анализа полиморфизма длины амплификационно-рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP- анализ) гена протективного антигена возбудителя, который мог бы стать доступной альтернативой секвенационному типированию этого гена. Целесообразным может быть дополнение существующих схем генетического анализа штаммов *B.anthraxis* маркерами единичных нуклеотидных повторов (SNR), которые проявляют высокую степень генетического полиморфизма (Цыганкова Е.А., Еременко Е.И., 2005; Muscillo M. et al., 2005; Stratilo Ch. et al., 2006), новыми VNTR-маркерами, а также замена определения SNP методом сиквенса на PCR-RFLP-анализ гена ПА. Решение этих задач позволило бы предложить приемлемый для нынешнего уровня оснащенности большинства лабораторий соответствующего профиля у нас в стране метод генетического типирования сибиреязвенного микроба.

Таким образом, исследования, направленные на поиск практически приемлемого методического подхода к генетическому типированию сибиреязвенного микроба, представляются актуальными.

ВЫВОДЫ

1. В результате поиска *in silico* в геноме *B.anthraxis* выявлено по три потенциально вариабельных области с тандемными повторами и единичными повторами нуклеотидов. Сконструированные праймеры к этим областям и оптимизированные параметры амплификации в ПЦР выявили разную степень их вариабельности.

2. Показано, что VNTR- локус PX 3-4 имеет два отличающихся аллельных варианта, присущих штаммам сибиреязвенного микроба с разной фенотипической экспрессией комплекса ассоциированных с вирулентностью признаков. Локус VNTR 39, находящийся в области гена адгезивного коллагенового белка у одних штаммов и в области псевдогена или межгенной области у других штаммов бацилл группы *Bacillus cereus*, имеет не менее четырех аллелей. Вариабельность этого локуса может влиять на характер адгезии у разных штаммов.

3. Три локуса с единичными нуклеотидными повторами имеют высокую степень индивидуальной генетической вариабельности у штаммов *B.anthraxis*. Индекс вариабельности P_{ic} для обеих групп штаммов практически одинаков, и составляет 0,864 для штаммов по вспышкам и 0,860 для штаммов из разных регионов. Величина P_{ic} PX F-R для штаммов из группы, сформированной по вспышкам, составляет 0,7758, а для штаммов из разных регионов – 0,7970. Индекс вариабельности P_{ic} локуса 16A *ch* для штаммов по вспышкам близок к единице и составляет 0,984, а для штаммов из разных регионов – 0,820.

4. Установлено, что эндонуклеазы Mfe I, PspE I, BstMC I имеют по одному сайту рестрикции в пределах последовательности гена ПА. Сконструированные праймеры к двум фрагментам гена ПА и оптимизированные параметры реакций рестрикции и амплификации для этих эндонуклеаз обеспечивают проведение генотипирования штаммов методом PCR-RFLP

5. Разработанный метод PCR-RFLP анализа гена протективного антигена позволяет обнаруживать не менее семи типов среди штаммов сибиреязвенного микроба.

резьвенного микроба. Метод отличается большей простотой и доступностью по сравнению с методом сравнительного определения полной нуклеотидной последовательности при аналогичной разрешающей способности.

6. С использованием метода PCR-RFLP показано, что чаще всего (49,5%) встречался 1 PCR-RFLP тип гена ПА, присущий как вирулентным изолятам разного географического происхождения, так и большинству вакцинных штаммов. Ко второму по частоте встречаемости 4 PCR-RFLP типу гена ПА, а также к редким 5 и 7 PCR-RFLP типам гена ПА принадлежали только штаммы, выделенные на Кавказе и в Закавказье. Наиболее вариабельными по PCR-RFLP типу гена ПА были штаммы, выделенные из почвы и из материала от больных и умерших от сибирской язвы людей. Морфологические колониальные варианты одного и того же штамма имели 2-3 разных PCR-RFLP типа гена ПА.

7. MLVA 8-ми вариабельных локусов выявил среди изученных штаммов шесть новых полных генотипов и пять неполных MLVA-генотипов *B. anthracis*, а также пять известных, но ранее не встречавшихся среди изолятов с территории СНГ генотипов.

8. Разработанный методический подход к генетическому тпированию сибиреязвенного микроба, основанный на сочетанном анализе маркеров MLVA, PCR-RFLP и SNR в нашей модификации, дает возможность сравнивать как штаммы, выделенные в разных географических регионах, так и дифференцировать изоляты из нескольких и даже одной вспышки сибиреязвенной инфекции. В предлагаемом методическом подходе к генотипированию *B. anthracis* MLVA-генотип в сочетанных схемах позволяет выявить принадлежность к определенному географическому региону и сопоставить полученные данные с мировой коллекцией *B. anthracis*. Включение в схемы маркеров PCR-RFLP гена ПА и SNR- локуса 16A ch разделяет штаммы из одной вспышки, имеющие одинаковый MLVA генотип, на групповые подтипы, а маркеров трех SNR-локусов – на индивидуальные генотипы.