

На правах рукописи

*Цыганова*

**ЦЫГАНКОВА** Ольга Ивановна

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ  
ШТАММОВ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА (ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И  
ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ)**

03.00.07 – микробиология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Ростов-на-Дону – 2007

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

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор  
**Еременко Евгений Иванович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор  
**Васильева Галина Ивановна**

доктор медицинских наук, профессор  
**Липницкий Анатолий Васильевич**

доктор медицинских наук  
**Яговкин Эдуард Александрович**

**Ведущая организация** – ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (п. Оболенск)

Защита состоится « 10 » ноября 2007 г. в « 10<sup>00</sup> » часов  
на заседании диссертационного совета Д 208.082.01 при ГОУ ВПО Ростовском го-  
сударственном медицинском университете (344022 г. Ростов-на-Дону, Нахичиван-  
ский пер., 29)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО Ростовского государ-  
ственного медицинского университета

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2007 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
профессор



Н.Я. Корганов

## Общая характеристика работы

### Актуальность проблемы

*Bacillus anthracis* – возбудитель острого инфекционного заболевания животных и людей – на протяжении длительного периода вызывает у исследователей неизменный интерес, обострившийся после недавнего прецедента использования спор данного микроорганизма в качестве агента биотерроризма (Evans R.G. et al., 2002; Hoffmaster A. R. et al., 2002; Jernigan D.B. et al., 2002; Riedel S., 2004). Серия террористических актов в США в 2001 г. наглядно продемонстрировала неготовность хорошо оснащенной и регулярно финансируемой лабораторной системы этой страны к массовому исследованию проб от людей и из внешней среды на наличие возбудителя сибирской язвы. Результатом этих актов биотерроризма явилась гибель людей, паника и гражданский хаос среди жителей страны, что, по мнению Г.Г.Онищенко (2003), является еще одним поражающим воздействием. По критериям оценки биологических агентов, представляющих потенциальную угрозу для населения, возбудитель сибирской язвы занимает второе место. Легкость культивирования *B. anthracis* и необычайная устойчивость его спор к неблагоприятным факторам внешней среды и дезинфицирующим средствам делают возбудителя сибирской язвы популярным агентом биотерроризма.

Помимо возможности применения возбудителя сибирской язвы в качестве агента биотерроризма, существует постоянная угроза проявления активности многочисленных стойких почвенных очагов данной инфекции. Примером могут служить небывалые по масштабам эпизоотии сибирской язвы летом и осенью 2006 г. в Северной Америке. За период с июля по сентябрь в трех провинциях Канады и четырех штатах США от сибирской язвы пало в общей сложности более 1000 голов домашнего скота и диких животных. В Канаде эпизоотии отмечались в 153 хозяйствах, при этом заболело два человека (Nishi J.S. et al., 2007).

На территории России за период с 1900 по 2003 год зарегистрировано более 35 тысяч стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов и более 70 тысяч вспышек инфекции. В каждом из таких пунктов имеется несколько почвенных очагов, причем по мере их рецидивирования и новых случаев падежа скота, как правило, возникают новые. Эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в РФ остается напряженной (Онищенко Г.Г., 2003).

Общность филогенетического происхождения представителей группы *Bacillus cereus*, почти полная гомология генома и схожесть некоторых фенотипических признаков, проявление которых подвержено внутривидовой вариабельности, – все это в некоторых случаях делает идентификацию *B. anthracis* затруднительной даже при использовании самого современного арсенала бактериологических, биохимических и молекулярно-генетических методов исследования (Paparaskevass J. et al., 2004; Okinaka R. et al., 2006).

Оценка надежности различных тестов идентификации сибирезывенного микроба требует изучения вариабельности фенотипических признаков, лежащих в их основе не только на уровне штаммов, но и внутри их популяций. Это диктует необходимость разработки более чувствительных методов определения различий в фенотипических свойствах отдельных составляющих популяции.

Важным противоэпидемическим звеном в борьбе с сибирской язвой является иммунопрофилактика, в частности вакцинация (Бакулов И.А. с соавт., 2001; Пименов Е.В. с соавт., 2002; Ivins E.B. et al., 1994; Turnbull P. et al., 2001). Штаммы, используемые в качестве вакцинных, должны обладать целым комплексом свойств: авирулентностью, иммуногенностью, продуктивностью спорообразования, стабильностью спор при хранении. Существует немало свидетельств неоднородности популяций вакцинных штаммов по тем или иным свойствам в отдельных сериях вакцинных препаратов (Кожухов В.В. с соавт., 1997; Сероглазов В.В., 1998). Отбор вариантов вакцинных штаммов *B. anthracis* с наиболее оптимальным комплексом свойств на основе популяционного анализа широкого спектра фенотипических признаков может не только обеспечить наиболее эффективную защиту иммунизированных лиц от возможности заболевания сибирской язвой, но и снизить экономические затраты на производство вакцины.

Сложность генетической идентификации *B. anthracis* обусловлена значительной гомологией геномов представителей группы *Bacillus cereus* и наличием четырех различных вариантов плазмидного состава штаммов возбудителя сибирской язвы. Объективная и достоверная молекулярно-генетическая идентификация сибиреязвенного микроба и его дифференциация от других представителей группы *B. cereus* может осуществляться лишь при использовании праймеров как к плазмидным, так и к специфическим хромосомным локусам. Отсутствие мультиплексной амплификационной тест системы, способной осуществлять детекцию штаммов сибиреязвенного микроба с любым плазмидным составом и надежно дифференцировать их от близкородственных сапрофитов, снижает роль быстрого и высокочувствительного метода ПЦР в исследовании проб материала от больных людей, животных и из объектов внешней среды на наличие *B. anthracis*.

Периодические проявления активности местных почвенных очагов и возникновение заболеваний животных или людей вследствие заноса инфекции с других территорий требуют разных подходов при проведении противоэпидемических мероприятий. Существенную помощь в решении этих вопросов может оказать применение методов молекулярно-генетического типирования выделенных во время вспышки штаммов возбудителя сибирской язвы. Получившая мировое признание схема молекулярно-генетического типирования штаммов *B. anthracis* на основе анализа характеристик полиморфных локусов с варибельным числом тандемных повторов (Keim.P. et al., 2000), требует наличия дорогостоящей аппаратуры, мало доступной большинству отечественных лабораторий, и нуждается в модификации.

Нет окончательной ясности и в вопросе о стабильности VNTR-маркеров в условиях воздействия различных селекционирующих факторов. Отсутствие данных о генотипах штаммов возбудителя сибирской язвы, выделенных на обширной территории России, в работах, посвященных глобальному распределению MLVA-генотипов *B. anthracis* (Van Ert M.N. et al., 2007) делает работу по их генотипированию актуальной, а ее результаты, несомненно, представляют интерес, как для отечественных, так и для зарубежных ученых.

Таким образом, актуальность изучения различных аспектов фенотипической и генетической варибельности обусловлена тесной связью этих вопросов с проблемами индикации и идентификации *B. anthracis*, оценкой вирулентности и иммуногенности, внутривидового типирования штаммов микроба с целью изучения филогенетических взаимоотношений штаммов различного происхождения и вариантов внутри групп, образованных производными исходного штамма.

## ВЫВОДЫ

1. Разработанный метод определения гемолитической активности позволяет четко дифференцировать колонии сибиреязвенного микроба по наличию и размерам зоны гемолиза. Отобранные на этой среде вариант I сибиреязвенного микроба, не обладающий гемолитической активностью, и вариант II с высоким ее уровнем, формировали колонии в R-форме и S-форме соответственно, что коррелировало с более высокой чувствительностью к сибиреязвенным бактериофагам у первых вариантов по сравнению со вторыми.

2. Клеточные популяции вакцинных штаммов с отличающейся иммуногенностью представлены вариантами микроба I и II в разных количественных отношениях. Индекс иммуногенности чистых культур варианта II, отличающихся более продуктивной споруляцией и термостабильностью спор, в опытах *in vivo* в 10 раз превышает таковой для культур варианта I, что дает возможность путем селекции отбирать вакцинные штаммы с высокими иммуногенными и продуктивными свойствами.

3. Суммарное проявление гемолитической активности и различия фенотипических вариантов возбудителя по этому признаку определяются соотношением уровня экзопродукции фосфолипаз и холестеринзависимого антролизина O, обеспечивающих гемолиз, и протеаз, деградирующих эти ферменты.

4. Метод дозированного высева спор на плотную питательную среду с последующей обработкой препаратом бактериофага позволяет определять доли фагорезистентных клонов в клеточных популяциях штаммов и проводить отбор фагорезистентных вариантов сибиреязвенного микроба. Клеточные популяции двух типичных штаммов *B. anthracis* содержат от 2,9 до 17,3% резистентных к бактериофагам «ВА-9», «К ВИЭВ» КОЕ соответственно и не содержат устойчивых к бактериофагу «Гамма А-26», а в популяциях отобранных вариантов данных штаммов с устойчивостью к одному из этих фагов содержится от 8 до 33% КОЕ с устойчивостью ко всем трем фагам, включая фаг «Гамма А-26».

5. Фенотипические свойства штаммов размножения сибиреязвенных бактериофагов оказывают влияние на литический спектр и специфическую активность препаратов данных бактериофагов. Экспериментально обоснован выбор штаммов *B. anthracis*, оптимальных для использования в качестве культур размножения бактериофагов «Гамма А-26», «ВА-9», «К»-ВИЭВ, «Саратов», а также предложен новый способ выращивания бактериофага «Гамма А-26», упрощающий и сокращающий процесс получения его препарата при сохранении показателей активности, специфичности с более широким литическим спектром.

6. Использование основных и дополнительных тестов позволяет выявить более высокую фенотипическую вариабельность штаммов возбудителя, чем позволяет

исследование по классической схеме. Главные отличия природных изолятов касаются признаков капсуло-, токсинообразования, гемолитической, лецитиназной, протеолитической активности и вирулентности, встречаясь по отдельности и в совокупности

7. Полученная изогенная система из 5 вариантов штамма 1(CO) с разным набором плазмид и различающихся по способности продуцировать капсулу и токсин, гемолитической и протеолитической активности, питательным потребностям, представляет собой удобную модель для экспериментального изучения генетической детерминации этих свойств.

8. Сконструированная мультиплексная амплификационная тест-система с набором из трех пар праймеров к специфическим последовательностям плазмидных и нового хромосомного локусов обеспечивает идентификацию штаммов сибирезавенного микроба с любым набором плазмид и диагностику сибирской язвы методом ПЦР у больных, включая лечившихся антибиотиками

9. Модификация метода MLVA ДНК *B. anthracis*, основанная на подборе состава амплификационных смесей, режима амплификации и параметров электрофореза, позволяет проводить анализ продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле с высоким разрешением, что делает методику доступной для более широкого практического применения.

10. MLVA-генотипы субкультур штаммов остаются стабильными в отсутствие селективного отбора. Впервые выявлена вариабельность MLVA-генотипов, характер которой определялся селективным отбором более вирулентных или независимых от триптофана вариантов.

11. MLVA выявил среди исследованных штаммов, выделенных на территории СНГ, 17 различающихся генотипов. Четыре генотипа принадлежали к известным ранее. Остальные 13 генотипов описаны впервые. Степень вариабельности данных штаммов сопоставима с таковой в пределах мировой коллекции.

12. Генотипирование *B. anthracis* в сочетании с филогенетическим анализом дает возможность дифференцировать штаммы, выделенные во время вспышек сибирской язвы на сопредельных территориях в одно и то же время. Полученные результаты впервые показывают пригодность MLVA для эпидемиологического анализа случаев заболевания сибирской язвой.