

А.Н.Мокриевич<sup>1</sup>, В.С.Тимофеев<sup>1</sup>, Т.Ю.Кудрявцева<sup>1</sup>, Г.И.Уланова<sup>2</sup>, С.Б.Карбышева<sup>2</sup>, Р.И.Миронова<sup>1</sup>,  
Г.М.Вахрамеева<sup>1</sup>, Т.И.Губарева<sup>2</sup>, В.М.Павлов<sup>1</sup>, И.А.Дятлов<sup>1</sup>

## ВЫДЕЛЕНИЕ СРЕДНЕАЗИАТСКОГО ПОДВИДА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА НА ТЕРРИТОРИИ АЛТАЙСКОГО КРАЯ

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk;

<sup>2</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае», Барнаул

В рамках деятельности референс-центра ФБУН ГНЦ ПМБ по мониторингу за туляремией генетически охарактеризованы 4 изолята туляремийного микроба, выделенные в 2011 г. на территории Алтайского края. Эти бактерии вирулентны для мышей линии BALB/c (DCL меньше 10 КОЕ). Методами однопраймерного ПЦР-типирования и мультилокусного анализа варибельности числа тандемных повторов (MLVA) показана принадлежность трех изолятов к среднеазиатскому подвиду, а одного – к голарктическому. Среднеазиатский подвид туляремийного микроба впервые выделен на территории Российской Федерации.

*Ключевые слова:* *Francisella tularensis*, subspecies *mediasiatica*, Алтайский край.

A.N.Mokrievich<sup>1</sup>, V.S.Timofeev<sup>1</sup>, T.Yu.Kudryavtseva<sup>1</sup>, G.I.Ulanova<sup>2</sup>, S.B.Karbysheva<sup>2</sup>, R.I.Mironova<sup>1</sup>,  
G.M.Vakhrameeva<sup>1</sup>, T.I.Gubareva<sup>2</sup>, V.M.Pavlov<sup>1</sup>, I.A.Dyatlov<sup>1</sup>

### Isolation of Central Asian Subspecies of Tularemia Agent in the Altai Territory

*State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk; Center of Hygiene and Epidemiology in the Altai Territory, Barnaul*

Within the frames of activities attributed to the Reference Center for tularemia monitoring at SRC AMB, genetically identified are 4 isolates of *Francisella tularensis*, isolated in 2011 in the Altai Territory. These bacteria prove to be virulent for BALB/c mice, DCL being lower than 10 CFU. Using single-primer PCR-typing and MLVA assay distinguished have been the subspecies of the isolates. Three of them refer to the Central Asian subspecies, one – to the Holarctic, the former being isolated in the territory of the Russian Federation for the first time ever.

*Key words:* *Francisella tularensis*, subspecies *mediasiatica*, Altai Territory.

Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция. Возбудитель туляремии, *Francisella tularensis*, инфицирует более 250 видов животных и передается человеку множеством способов – прямым контактом с зараженным животным, приемом внутрь контаминированной воды и пищи, аэрогенным путем, а также через укусы клещей, мух и комаров.

Возбудитель туляремии относится к семейству *Francisellaceae*. Семейство *Francisellaceae* включает в себя, кроме единственного рода *Francisella*, симбиотические бактерии рода *Wolbachia*, выделенные из клещей *Argas arboreus*, а также *Francisella*-подобные эндосимбионты, выделенные из клещей видов *Amblyomma maculatum*, *Ornithodoros porcinus*, *Ornithodoros moubata* и *Dermacentor (D. variabilis)*, *D. andersoni*, *D. hunteri*, *D. nitens*, *D. occidentalis* и *D. albipictus* [5].

К роду *Francisella* относят в настоящее время 2 вида: *F. tularensis* и *F. philomiragia*. Однако в последнее время появился целый ряд публикаций, в которых описаны случаи заболевания различных видов животных, вызванные новыми видами франциселл: *Francisella hispaniensis*, *Francisella asiatica* и *Francisella noatunensis* (syn. *Francisella piscicida*) [7, 9, 10]. Последовательность гена 16S РНК возбудителей данных инфекций имеет до 99 % гомологии с последовательностью гена 16S РНК *Francisella tularensis* и до 98 % гомологии с последовательно-

стью гена 16S РНК *Francisella philomiragia*. Внутри вида *F. tularensis* различают 4 подвида: *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* и *F. tularensis* subsp. *novicida* [5]. Следует отметить, что штаммы подвида *mediasiatica* до настоящего времени выделялись только на территории Средней Азии [4].

Для бактерий *F. tularensis* характерен высокий консерватизм фенотипа (антигенная и биологическая однородность, невысокая биохимическая активность и др.) [4], поэтому детальное расследование вспышек заболевания для выявления источника инфекции в настоящее время затруднительно без комплекса молекулярно-биологических методов, способных однозначно относить выделенные изоляты к определенному подвиду и внутри подвида к определенному генетическому кластеру, что исключительно важно в свете требований современного здравоохранения и реальной угрозы биотерроризма. Для решения этой задачи нами был ранее предложен метод ПЦР-диагностики для подвидовой дифференциации туляремийного микроба, основанный на применении праймера Chi1f [2]. При этом нарабатывается спектр ампликонов, характерный как для вида *F. tularensis* в целом, так и для отдельных подвигов туляремийного микроба. Однако данный метод не позволяет внутри подвида отнести исследуемый изолят к определенному генетическому кластеру, что затрудняет как

выявление связи с эндемичными штаммами туляремийного микроба, так и локализацию распространения конкретных штаммов в эндемичных по туляремии районах. Для решения данной задачи наиболее перспективно использование метода мультилокусного анализа числа tandemных повторов (MLVA). Общепринято для туляремийного микроба использовать с целью внутривидового субтипирования штаммов *F. tularensis* метод MLVA по 25 локусам [8].

На территории бывшего Советского Союза, в основном, обнаруживаются штаммы подвида *F. tularensis* subsp. *holartctica*, однако индивидуальные различия геномов циркулирующих штаммов до сегодняшнего дня изучены мало. Анализ 352 штаммов всех подвидов возбудителя туляремии методом определения вариабельного числа tandemных повторов (VNTR) по четырем локусам позволил выявить 61 генотип и продемонстрировать генотипическую гетерогенность российских штаммов [3].

Целью работы являлось определение подвидовой принадлежности штаммов, поступивших в референс-центр по мониторингу за туляремией ФБУН ГНЦ ПМБ из Центра гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае, методом однопраймерной ПЦР, а также их генотипирование методом MLVA по 25 VNTR-локусам.

### Материалы и методы

В работе использованы штаммы *F. tularensis*:

4 изолята, выделенные на территории Алтайского края, 12 штаммов различного географического происхождения из коллекции «ГКПМ-Оболенск» и 12 штаммов, типичных для сибирских очагов туляремии, полученных из коллекции Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока (таблица).

Культивирование бактерий *F. tularensis* проводили при температуре 37 °С на среде FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ) с добавлением полимиксина В (Pm). Для определения чувствительности к эритромицину культуры высевали на среду, содержащую эритромицин 50 мкг/мл.

Выделение ДНК осуществляли методом нуклеосорбции на силикагеле в присутствии гуанидин-тиоцианата с использованием коммерческого набора «Рибо-сорб» («ИнтерЛабСервис») из биомассы суточной агаровой культуры.

В работе использовали мышей линии BALB/c. Определение DCL проводили по методу Кербера в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1]. Мышей (по 5 в группе, самцы и самки, возраст 6–8 нед., массой 18–20 г) инфицировали подкожно бактериальной суспензией в дозах 1·10<sup>1</sup>, 1·10<sup>2</sup> и 1·10<sup>3</sup> КОЕ/мышь и наблюдали в течение 21 дня.

Для VNTR-анализа использовали 25 пар праймеров (Ft-M1 – Ft-M25), последовательности которых приведены в статьях [6, 8, 11]. Условия проведения ПЦР рассчитывали с помощью пакета программ Vector NTI. Размеры ампликонов определяли по их

Штаммы *F. tularensis*, использованные в работе

| Подвид                                 | Штамм       | Место выделения                                    | Источник выделения           | Год выделения |
|--|-------------|--|------------------------------|---------------|
| Природный изолят                       | A-554       | Алтайский край, Ельцовский район, с. Мартыново     | Клещи <i>H. concinna</i>     | 2011          |
| Природный изолят                       | A-678       | Алтайский край, Первомайский район, с. Покровка    | Клещи <i>Ix. persulcatus</i> | 2011          |
| Природный изолят                       | A-823       | Алтайский край, Шелаболихинский район, с. Молоково | Сибирская красная полевка    | 2011          |
| Природный изолят                       | A-1045      | Алтайский край, Алейский район, п. Дружба          | Клещи <i>D. reticulatus</i>  | 2011          |
| <i>tularensis</i>                      | Schu        | США  | Человек                      | 1941          |
| <i>tularensis</i>                      | B399 A-Cole | США  | Человек                      | 1972          |
| <i>tularensis</i>                      | 8859        | США  | Жеребенок                    | 1958          |
| <i>holartctica</i>                     | 9           | Московская область                                 | Обыкновенная полевка         | 1948          |
| <i>holartctica</i>                     | 21/400      | Московская область                                 | Водяная крыса                | 1949          |
| <i>holartctica</i>                     | 15/10       | Алма-Ата   | Водяная крыса                | 1942          |
| <i>holartctica</i>                     | 503         | Московская область                                 | Клещи <i>D. pictus</i>       | 1949          |
| <i>holartctica</i> bv. <i>japonica</i> | Miura       | Япония   | Человек                      | 1975          |
| <i>holartctica</i> bv. <i>japonica</i> | Jasoe       | Япония   | Человек                      | 1974          |
| <i>mediasiatica</i>                    | 117         | Казахстан  | Клещи <i>Hyalomma</i> sp.    | 1960          |
| <i>mediasiatica</i>                    | 120         | Средняя Азия                                       | Человек                      | 1968          |
| <i>novicida</i>                        | 112         | Юта, США   | Вода                         | 1955          |
| <i>holartctica</i>                     | I-282       | Читинская область                                  | Хомяк                        | 1971          |
| <i>holartctica</i>                     | I-305       | Читинская область                                  | Клещи <i>D. nuttalli</i>     | 1972          |
| <i>holartctica</i>                     | I-329       | Республика Бурятия                                 | Восточная полевка            | 1973          |
| <i>holartctica</i>                     | I-346       | Республика Бурятия                                 | Ондатра                      | 1977          |
| <i>holartctica</i>                     | I-347       | Республика Бурятия                                 | Ондатра                      | 1978          |
| <i>holartctica</i>                     | I-349       | Читинская область                                  | Полевка Брандта              | 1977          |
| <i>holartctica</i>                     | I-365       | Республика Бурятия                                 | Ондатра                      | 1988          |
| <i>holartctica</i>                     | I-367       | Красноярский край                                  | Обыкновенная полевка         | 1989          |
| <i>holartctica</i>                     | I-373       | Читинская область                                  | Даурская пищуха              | 1989          |
| <i>holartctica</i>                     | I-382       | Республика Бурятия                                 | Бурозубка                    | 1991          |
| <i>holartctica</i>                     | I-387       | Новосибирская область                              | Бурозубка                    | 2010          |
| <i>holartctica</i>                     | I-388       | Новосибирская область                              | Вода                         | 2011          |

электрофоретической подвижности в 3 % агарозном геле по отношению к подвижности молекулярных маркеров (шаг 20 п.о., BIO-RAD, США) с помощью программы PhotoCaptMw. Фотографирование гелей проводили с использованием системы геледокументирования Vilber Lourmat (Франция). При анализе локусов Ft-M1 и Ft-M25 определяли нуклеотидную последовательность ампликонов.

### Результаты и обсуждение

Для первоначальной характеристики свойств четырех культур *F. tularensis*, выделенных в разных районах Алтайского края в летне-осенний период 2011 г. и поступивших из Центра гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае, была определена вирулентность для мышей и чувствительность к эритромицину. Все штаммы обладали фенотипом EryS и были высоковирулентными (DCL < 10 КОЕ).

Для молекулярно-генетического подтверждения принадлежности исследуемых штаммов к виду *F. tularensis* был проведен ПЦР-анализ с использованием праймеров, специфичных к генам *fopA* (5'-GCAAATCTAGCAGGTC AAGCAACAGGT-3' и 5'-CATCACCATTATTGTATAGCACGCGAC-3') и *iglC* (5'-ACAGGTAACAAGTGGCGAGACC-3' и 5'-AAACACCCATAAGTTCTGTTGGCTC-3') бактерии *F. tularensis*. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с использованием праймера Chi1f и лизатов бактериальных образцов, приведена на рис. 1.

В дорожках всех изолятов присутствуют полосы с размерами ~280 и ~830 п.о., общие для бактерий вида *F. tularensis*, что подтверждает принадлежность исследуемых штаммов к виду *Francisella tularensis*. Наличие фрагмента размером ~570 п.о., характерного для голарктического подвида, у культуры А-1045 свидетельствует о ее принадлежности к подвиду *holarctica*. Дорожки с образцами, полученными из лизатов штаммов А-554, А-678, А-823, содержат ампликон размером ~950 п.о., специфичный для подвидов *mediasiatica* и *tularensis*, но не содержат ампликон размером ~500 п.о., что позволяет отнести изучаемые изоляты к подвиду *mediasiatica*.

Для выяснения филогенетических связей исследуемых штаммов со штаммами, депонирован-

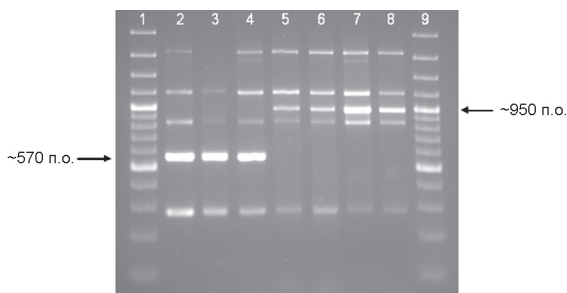


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов, полученных ПЦР с праймером Chi1f и ДНК *F. tularensis*:

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

ными в «ГКПМ-Оболенск», в том числе со штаммами из сибирских очагов туляремии, полученными из Иркутского противочумного института, был проведен VNTR-анализ по схеме, предложенной A.Johanson и соавт. [8]. По полученным данным было построено филогенетическое дерево на основе метода невзвешенного попарного арифметического среднего (UPGMA), который считается наиболее приемлемым для филогенетических построений (рис. 2). Проведенный анализ подтвердил установленную методом однопраймерного типирования подвиговую принадлежность изучаемых штаммов туляремиального микроба: штамм А-1045 относится к голарктическому, а штаммы А-554, А-678 и А-823 – к среднеазиатскому подвиду.

При этом штамм А-1045 находится в одном кластере со штаммами, типичными для сибирских очагов туляремии, незначительно отличаясь от них по своему VNTR-профилю. Географическое место выделения штамма А-1045 (рис. 3) находится на границе ареала распространения проанализированных штаммов, типичных для сибирских очагов туляремии. Территориальная и генетическая общность этих штаммов, на наш взгляд, позволяет выделить отдельно сибирскую популяцию возбудителя туляремии подвида *holarctica*.

Штаммы А-554 и А-678 являются генетически идентичными по 25 VNTR-локусам. Штамм А-823 отличается от них по длине трех локусов (Ft-M3, Ft-M7 и Ft-M20), в том числе гипервариабельного локуса Ft-M3, позволяющего выявлять различия между

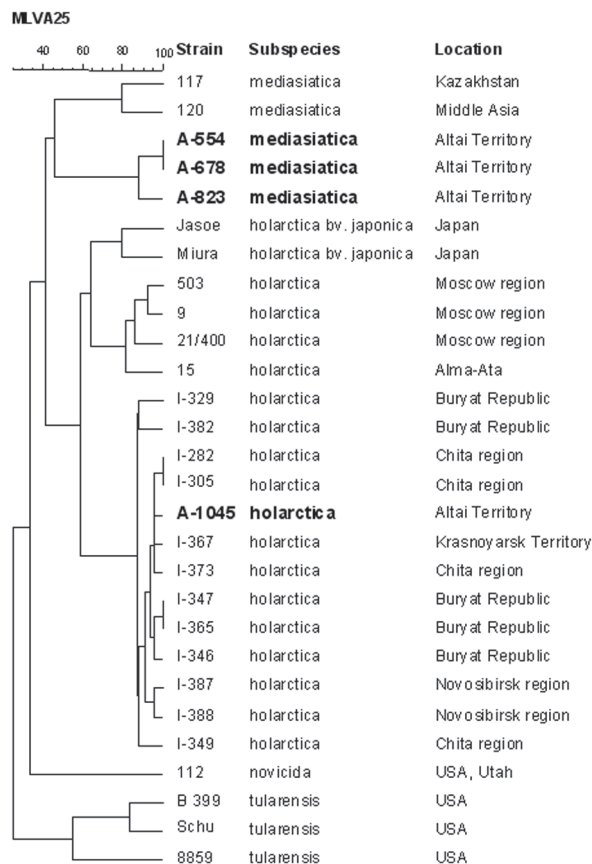


Рис. 2. Филогенетическое дерево штаммов *F. tularensis*

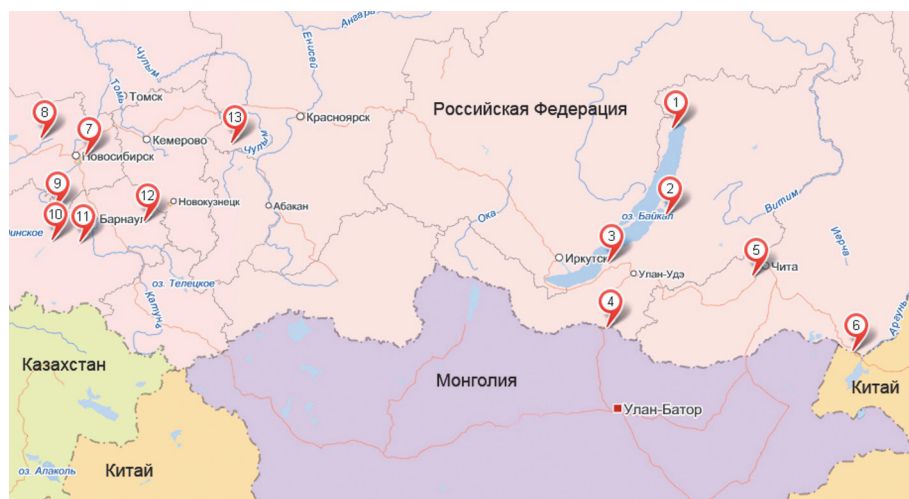


Рис.3. Карта распространения штаммов *F. tularensis*, полученных из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае» и Иркутского НИПЧИ:

1 – I-346, I-347; 2 – I-382; 3 – I-365; 4 – I-329; 5 – I-349; 6 – I-282, I-305, I-373; 7 – I-388; 8 – I-387; 9 – A-823; 10 – A-678; 11 – A-1045; 12 – A-554; 13 – I-367

близкородственными штаммами [8]. При этом различия в длине VNTR-локусов между штаммами A-554, A-678 и A-823 меньше, чем с двумя другими представленными в коллекции ФБУН ГНЦ ПМБ штаммами среднеазиатского подвида туляремийного микроба (117 и 120). Данное наблюдение демонстрирует наличие в Алтайском крае генетически обособленной популяции *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, ареал распространения которой территориально перекрывается с западной частью ареала распространения сибирских штаммов голарктической расы туляремийного микроба (рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют о циркуляции двух подвидов туляремийного микроба на территории Алтайского края. Алтайский изолят подвида *holarctica* генетически близок штаммам, типичным для сибирских очагов туляремии, тогда как три изолята подвида *mediasiatica* отличаются от ранее выделенных на территории Средней Азии штаммов (117 и 120). В литературе отсутствуют данные о выделении культур туляремийного микроба подвида *mediasiatica* на территории Российской Федерации, что может свидетельствовать либо о слабой изученности очагов туляремии, либо о дрейфе среднеазиатских штаммов в сторону Сибири.

Использование 25-локусного VNTR-анализа позволило выявить 25 генотипов среди 28 исследованных штаммов возбудителя туляремии, что существенно превышает разрешение, полученное при анализе 4 локусов [3]. Метод ПЦР дифференциация подвидов *Francisella tularensis* с помощью одного праймера [2] позволил с минимальными затратами определить подвидовую принадлежность свежвыделенных туляремийных культур.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 179 с.  
 2. Вахрамеева Г.М., Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Миронова Р.И., Дятлов И.А. ПЦР дифференциация подвидов *Francisella tularensis* с помощью одного праймера. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):46–8.  
 3. Водопьянов А.С., Мишанькин Б.Н., Павлович Н.В., Пичурина Н.Л. Генотипическая гетерогенность и географическое разнообразие коллекционных штаммов *F. tularensis* по данным VNTR-анализа их ДНК. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2007; 2:33–40.

4. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 192 с.

Источники 5–11 см. в References

**References**

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz; 1962. 179 p.  
 2. Vakhrameeva G.M., Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Mironova R.I., Dyatlov I.A. [PCR differentiation of *Francisella tularensis* subspecies using one primer]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; (107):46–8.  
 3. Vodopyanov A.S., Mishan'kin B.N., Pavlovich N.V., Pichurina N.L. [Genotype heterogeneity and geographical diversity of *F. tularensis* collection strains in accordance with VNTR-assay of their DNA]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2007; 2:33–40.  
 4. Olsuf'ev N.G. [Taxonomy, Microbiology and Laboratory Diagnostics of *Francisella tularensis*]. M.: Meditsina; 1975. 192 p.  
 5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. 2005. Vol. 2. P. 199–210.  
 6. Chanturia G., Birdsell D.N., Kekelidze M., Zhgenti E., Babuadze G., Tsertsvadze N., Tsanova S., Imnadze P., Beckstrom-Sternberg S.M., Beckstrom-Sternberg J.S., Champion M.D., Sinari S., Gyurancz M., Farlow J., Pettus A.H., Kaufman E.L., Busch J.D., Pearson T., Foster J.T., Vogler A.J., Wagner D.M., Keim P. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* from the country of Georgia. BMC Microbiol. 2011; 11:139.  
 7. Huber B., Escudero R., Busse H.J., Seibold E., Scholz H.C., Anda P., Kämpfer P., Spletstoesser W.D. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. Int. J. Syst. Evol. Micr. 2010; 60(Pt 8):1887–96.  
 8. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Bystrom M., Fox J., Chu M., Forsman M., Sjöstedt A., Keim P. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J. Bacteriol. 2004; 186:5808–18.  
 9. Mikalsen J., Colquhoun D.J. *Francisella asiatica* sp. nov. isolated from farmed tilapia (*Oreochromis* sp.) and elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* to species rank as *Francisella noatunensis* comb. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. [Internet]. Published ahead of print 25 Sep 2009 [cited 19 Dec 2012]. Available from: <http://ijsb.sgmjournals.org/content/early/2009/09/25/ijsb.0.002139-0.full.pdf>  
 10. Soto E., Hawke J., Fernandez D., Morales J.A. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Costa Rica. J. Fish Dis. 2009; 32:713–22.  
 11. Vogler A.J., Birdsell D., Wagner D.M., Keim P. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. Lett. Appl. Microbiol. 2009; 48:140–4.

**Authors:**

Mokrievich A.N., Timofeev V.S., Kudryavtseva T.Yu., Mironova R.I., Vakhrameeva G.M., Pavlov V.M., Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org  
 Ulanova G.I., Karbysheva S.B., Gubareva T.I. Center of Hygiene and Epidemiology in the Altai Territory. Barnaul.

**Об авторах:**

Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Павлов В.М., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org  
 Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Губарева Т.И. Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае. Барнаул.

Поступила 24.07.12.