

В.М.Павлов¹, И.И.Козлова², А.Н.Мокриевич¹, О.Д.Шутко², В.С.Тимофеев¹, Р.И.Миронова¹,
Т.С.Кузнецова², Н.М.Файзуллина², Т.Ю.Кудрявцева¹, Т.И.Комбарова¹, И.А.Дятлов¹

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ И МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ ВО ВРЕМЯ ЭПИДЕМИИ ТУЛЯРЕМИИ В ХАНТЫ-МАНСЬИСКЕ В 2013 г.

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk, Российская Федерация; ²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре», Ханты-Мансийск, Российская Федерация

В работе приведены данные о выделении культур *Francisella tularensis* от людей и грызунов во время эпидемии туляремии среди жителей Ханты-Мансийска в августе–сентябре 2013 г. Все выделенные штаммы *F. tularensis* (шесть культур туляремиального микроба от больных и четыре – от мелких грызунов, отловленных в городе и его окрестностях) 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 от людей, образуют три группы, а штаммы, выделенные от мелких грызунов – две, причем в одну из групп Ханты-Мансийского кластера попали штаммы, выделенные как от людей, так и грызунов.

Ключевые слова: туляремия, *Francisella tularensis*, однопраймерное типирование, MLVA-типирование, антибиотики.

V.M.Pavlov¹, I.I.Kozlova², A.N.Mokrievich¹, O.D.Shutko², V.S.Timofeev¹, R.I.Mironova¹, T.S.Kuznetsova²,
N.M.Faizullina², T.Yu.Kudryavtseva¹, T.I.Kombarova¹, I.A.Dyatlov¹

Characteristics of Tularemia Agent Strains Isolated from Patients and Small Rodents during Tularemia Epidemic in Khanty-Mansiisk in 2013

¹State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation; ²Center of Hygiene and Epidemiology in the Khanty-Mansiisk Autonomous District – Yugra, Khanty-Mansiisk, Russian Federation

The paper contains the data on isolation of *Francisella tularensis* cultures from humans and rodents during tularemia epidemic in Khanty-Mansiisk in August–September, 2013. All the obtained *F. tularensis* strains (six cultures of tularemia microbe from patients, and four cultures – from small rodents caught in the territory of the city and its suburbs) fall under Holarctic subspecies, are highly virulent for the laboratory mice, resistant to erythromycin, ampicillin, and cephalosporin, but sensitive to amikacin, tetracycline, doxycycline, and gentamycin. Using 25-locus-MLVA typing it is demonstrated that the strains under study form a common cluster on the phylogenetic tree along with *F. tularensis* strains previously isolated in the territory of the Southern Urals and Kazakhstan. All the strains from the foci are closely related ones, and based on the investigations of hyper-variable Ft-M3 locus, fall into four groups. The strains, isolated from humans, combine into three groups, and the strains isolated from rodents – into two, and notably that one of the groups of Khanty-Mansiisk cluster comprises the strains isolated from both humans and rodents.

Key words: tularemia, *Francisella tularensis*, single-primer typing, MLVA-typing, antibiotics.

Туляремия – острое инфекционное заболевание животных и человека, вызывается бактериями *Francisella tularensis*. В Российской Федерации возбудитель туляремии обнаруживается на территории практически всех краев, областей и республик.

Ханты-Мансийский автономный округ расположен в природном очаге туляремии пойменно-болотного типа, где основным резервуаром являются водная полевка, красная полевка, ондатра, красно-серая полевка. Переносчиками служат комары и слепни, которые обильно населяют округ в силу особенностей его гидрографии.

Анализ многолетней заболеваемости свидетельствует о высокой активности и стойкости природного очага. В 30–50-х годах прошлого века вспышки туляремии регистрировались на всей территории округа.

В 60-е годы, с началом массовой вакцинации на-

селения округа, произошло резкое снижение заболеваемости. Кроме того, на активность очага оказало влияние сокращение численности водяной полевки и ондатры из-за интенсивного освоения восточных районов округа в связи с разработкой нефтегазовых месторождений.

В то же время в западных и центральных районах (Кондинский, Ханты-Мансийский, Октябрьский районы) сохранялась высокая активность природного очага, что на фоне снижения объемов иммунизации привело к крупным вспышкам в 1983–1985 гг. Данную эпидемию удалось ликвидировать в результате сплошной вакцинации населения.

За последние 20 лет заболеваемость регистрировалась в 5 муниципальных образованиях. С 1993 г. зарегистрировано 34 случая заболевания, в том числе 2 групповых: пгт. Березово в 2007 г. – 22 случая,

Октябрьский район в 1998 г. – 6 случаев. В Ханты-Мансийске последний случай туляремии зарегистрирован в 2001 г. В 2012 г. случаев туляремии в округе не регистрировали.

В 2010–2012 гг. наблюдали нарастание эпизоотической активности природных очагов туляремии в Ханты-Мансийском, Сургутском, Нефтеюганском, Октябрьском районах и городах Ханты-Мансийск, Нижневартовск, Нягань, Сургут, Пыть-Ях. Серологический анализ биологического материала, взятого от рыжих и красных полевок, показал наличие специфических титров у большинства исследованных животных от 1:20 до 1:80.

В 2013 г. произошло резкое обострение эпизоотической ситуации по туляремии на значительной части территории округа. По данным Иркутского НИПЧИ, при исследовании методом ИФА 189 экзemplаров грызунов на туляремию получено 107 положительных (56,6 %) серологических результатов в реакции РНГА с эритроцитарным тулярийным диагностикумом.

Обширная эпизоотия в пойменных очагах Округа способствовала массовому заражению тулярией жителей Ханты-Мансийска. За август–сентябрь 2013 г. заболели тулярией, по официальным данным, 1005 человек, в том числе 156 детей. Масштабы эпидемии заставили объявить в городе и на прилегающих территориях режим чрезвычайной ситуации, который был отменен только в октябре 2013 г.

Заболевание характеризовалось повышением температуры до 40,0 °С, ознобом, слабостью, недомоганием, ломотой в теле, у всех больных отмечалось увеличение периферических лимфоузлов, болезненных при пальпации. У многих больных отмечен гиперемизированный след укуса насекомого с просветлением в центре, у некоторых – язвочка или вскрывшийся фурункул.

При анализе по месту заражения установлено, что 34,42 % заболевших заразились в городской черте, 36,13 – при отдыхе и постоянном проживании на дачных участках, 11,95 – на рыбалке, 9,96 – в местах массового отдыха, 7,25 – при нахождении на территории Ханты-Мансийского района, 0,28 – на охоте.

В данной работе проведен анализ образцов биологического материала, отобранного из пустул пациентов Окружной больницы Ханты-Мансийска с диагнозом «туляремия»; мелких грызунов, отловленных на территории окружного центра и его окрестностей в период с 23.08.2013 по 29.09.2013 г., на наличие возбудителя туляремии. Выделенные культуры изучены микробиологическими и биологическими методами, а также методами однопраймерного ПЦР и MLVA по 25 локусам.

Материалы и методы

В работе использовали 10 штаммов, выделенных от пациентов и мелких грызунов в Ханты-Мансийске. Для однопраймерного ПЦР-типирования использо-

вали праймер *Chilf* [2]. Для MLVA-анализа использовали праймеры, последовательности которых приведены в работе A. Johanson *et al.* [6].

Бактерии выращивали на среде FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ) с добавлением полимиксина В (Pm) в концентрации 100 мкг/мл⁻¹ при температуре 37 °С. Определение антибиотикочувствительности тулярийного микроба проводили диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.2495-09 [5]. На засеянный агар (по 0,2 мл из суспензии, стандартизированной по отраслевому стандартному образцу мутности 5 ед. (ОСО 42-28-86 П) наносили диски с эритромицином 15 мкг, ампициллином 10 мкг, цефтриаксоном 30 мкг, цефуроксимом 30 мкг, цефокситином 30 мкг, цефтазидимом 30 мкг, цефотаксимом 30 мкг, цефепином 30 мкг, амикацином 30 мкг, тетрациклином 30 мкг, доксициклином 10 мкг и гентамицином 10 мкг.

Биологический материал получен от пациентов с диагнозом «туляремия» и мелких грызунов, отловленных на территории окружного центра и его окрестностей. Содержимое пустул забирали с помощью стерильного ватного тампона и переносили в пробирки с 200 мкл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Высевы из пустул проводили на FT-агар и инкубировали в течение 6 сут.

Для выявления возбудителя туляремии в грызунах проводили вскрытие отловленных животных и забор селезенки. Высевы из селезенки проводили методом отпечатков на FT-агар и из суспензий гомогенизированных селезенки в 0,9 % раствор натрия хлорида.

Гомогенат селезенки грызунов вводили подкожно по 0,1 мл трем мышам линии BALB/c (по 5 в группе, самцы и самки, возраст 6–8 недель, массой 18–20 г). За мышами наблюдали в течение 21 сут. Одну мышь на 5-е сутки после заражения эвтаназировали и делали высев суспензии селезенки, полученной растиранием органа в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, на чашки с FT-агаром.

DCI культур *F. tularensis* для мышей линии BALB/c оценивали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [1]. Мышей (по 5 в группе) инфицировали подкожно бактериальной суспензией в дозах 1·10¹, 1·10² и 1·10³ КОЕ/мышь и наблюдали в течение 21 сут.

Для определения видовой принадлежности культур использовали набор реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии (ИХ-тест *F. tularensis*) (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Выделение ДНК *F. tularensis* из биомассы суточной агаровой культуры осуществляли с использованием коммерческого набора «Рибсорб» («ИнтерЛабСервис»). Для детекции гена *iglC* использовали праймеры, приведенные в [3]. Однопраймерную ПЦР с праймером *Chilf* проводили, как описано ранее [2].

При амплификации использовали термоци-

клер «Applied biosystem 2700», США. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1,8 % агарозном геле. ДНК в геле окрашивали бромистым этидием. Фотодокументирование проводили на системе для гель-документирования Vilber-Lourmat (Франция), при ультрафиолетовом освещении с помощью транс-иллюминатора фирмы «Cole Parmer», США. Для определения размеров ампликонов использовали маркер молекулярных масс GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва).

Для VNTR-анализа использовали 25 пар праймеров (Ft-M1–Ft-M25), последовательности которых приведены в статье A.Johanson *et al.* [6]. Праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва). Условия проведения ПЦР рассчитывали с помощью пакета программ Vector NTI. Размеры ампликонов определяли по их электрофоретической подвижности в 3 % агарозном геле по отношению к подвижности молекулярных маркеров (шаг 20 п.о., BIO-RAD, США) с помощью программы PhotoCaptMw. При анализе локусов Ft-M1 и Ft-M25 определяли нуклеотидную последовательность ампликонов.

Филогенетическое дерево строилось с использованием программного комплекса BioNumerics (Softline, США) на основе метода невзвешенного парного арифметического среднего (UPGMA).

Результаты и обсуждение

Анализ образцов биологического материала, отобранных из пустул пациентов Окружной больницы Ханты-Мансийска с диагнозом «туляремия». Биологический материал был взят у семи пациентов. У шести пациентов при высеве содержимого пустул на FT-агар через 4 сут обнаружен рост культуры туляремиального микроба. Видовая принадлежность культур подтверждена ИХ-тестом. При расщеве полученных культур до изолированных колоний оказалось, что все культуры, кроме одной, представлены однородными колониями. Для дальнейшего анализа отобрали по одной колонии из каждой культуры, обозначенные как штаммы X-3, X-4, X-7 и X-10. Культура, выделенная от одного пациента, при расщеве до изолированных колоний содержала два типа морфологически отличных колоний, различающихся по размеру: мелкие (одна из которых обозначена как штамм X-8M) и крупные (одна из которых обозначена как штамм X-8K). Все отобранные штаммы были высоковирулентны для лабораторных мышей (DCI<10 КОЕ).

Анализ образцов биологического материала от мелких грызунов, отловленных на территории Ханты-Мансийска и его окрестностей в период с 23.08.2013 по 26.08.2013 г. Для бактериологического анализа отловлено 24 грызуна (15 красных полевок, 7 буроzubок и 2 серых домовых мыши). Возбудитель туляремии обнаружен в 4 селезенках, взятых из трех красных полевок (для анализа отобрали по одной колонии этих культур и обозначили как штаммы

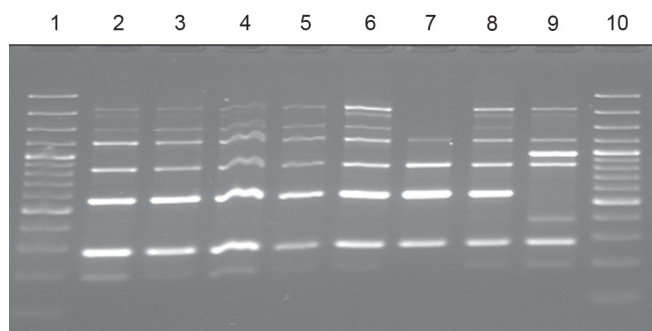


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов, полученных с праймером *Chilf* и ДНК:

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

X-23/1, X-23/3, X-25/1) и буроzubки (штамм X-26/2). Видовая принадлежность выделенных культур подтверждена ИХ-тестом. Все отобранные штаммы были высоковирулентны для лабораторных мышей (DCI<10 КОЕ).

Определение подвиговой принадлежности выделенных штаммов возбудителя туляремии. Все штаммы содержат, по данным ПЦР-анализа, видоспецифичный ген *iglC* *F. tularensis*, что подтверждает их принадлежность к роду *Francisella* (данные не приведены). Спектр ампликонов в ПЦР с праймером *Chilf* выделенных штаммов идентичен спектру, характерному для бактерий *F. tularensis* subsp. *holarctica* [2] (рис. 1).

Все штаммы образуют в однопраймерной ПЦР ампликоны с размерами ~280 и ~830 п.о., общие для бактерий вида *F. tularensis*, что подтверждает принадлежность исследуемых штаммов к данному виду. Наличие фрагмента размером ~570 п.о. характерно для голарктического подвида. Для сравнения на рис. 1 приведена электрофореграмма ампликонов, полученных с использованием ДНК *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

Чувствительность к эритромицину. Все 10 штаммов, выделенных от людей и грызунов, оказались устойчивыми к эритромицину, то есть относятся к биовару II (Ery^R) [4].

Генотипирование штаммов методом MLVA. Для выяснения филогенетического родства исследуемых штаммов между собой, а также со штаммами, выделенными ранее из очагов туляремии Сибири, Урала и Казахстана, проведен VNTR-анализ по схеме, предложенной A.Johanson *et al.* [6]. По полученным данным построено филогенетическое дерево (рис. 2). VNTR-анализ подтвердил подвиговую принадлежность изучаемых штаммов туляремиального микроба к голарктическому подвиду.

Исследованные штаммы являются генетически идентичными по 24 VNTR-локусам, отличаясь между собой лишь по гипервариабельному локусу Ft-M3 (таблица). Различия в длине данного локуса позволяют разделить изучаемые штаммы на 4 индивидуальных генотипа, содержащих 9, 10, 15 и 17 повторов.

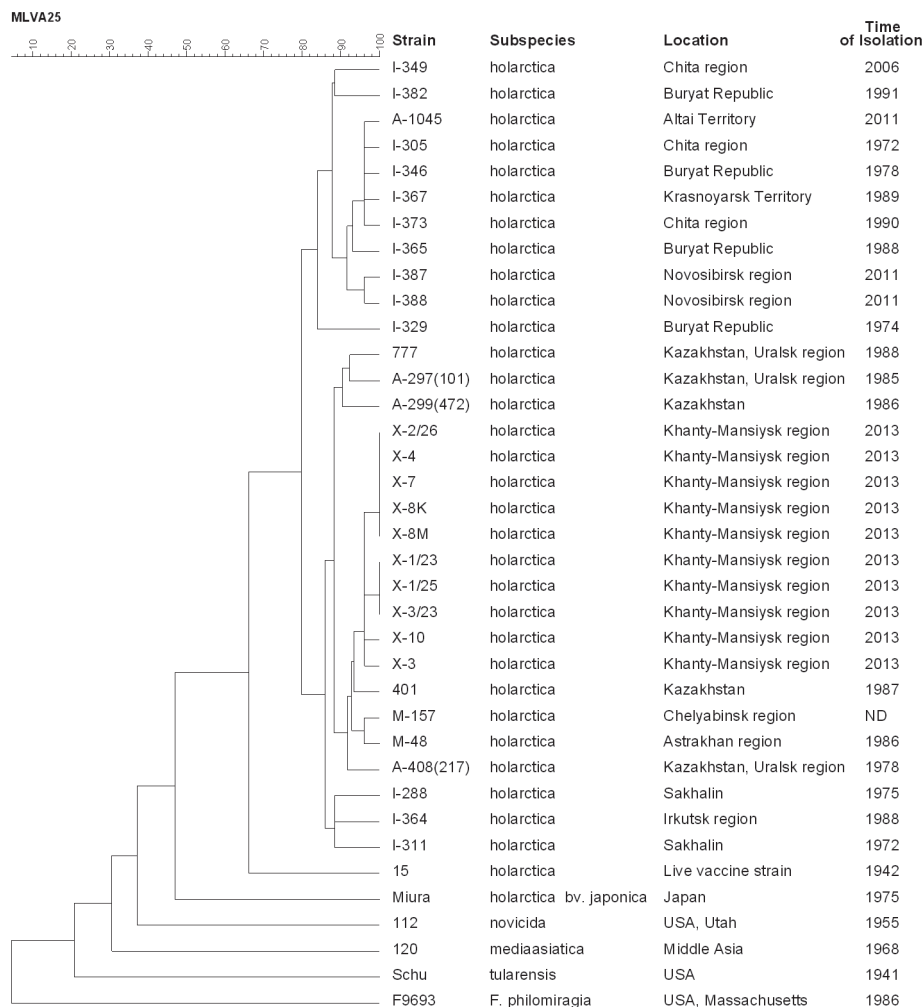


Рис. 2. Филогенетическое родство штаммов *F. tularensis*, выделенных в Ханты-Мансийске, со штаммами из близлежащих очагов туляремии

Штаммы, содержащие 15 повторов в локусе Ft-M3, составляют 50 % от общего числа. Данный генотип обнаружен как в штаммах, выделенных от людей, так и от буроzubки (штамм X-2/26). У остальных трех штаммов, выделенных от грызунов, обнаружено по 17 повторов в данном локусе. Все штаммы располагаются одним кластером, проявляя при этом наибольшее родство со штаммами, выделенными ранее на территории Южного Урала и Казахстана (рис. 2).

Таким образом, все выделенные штаммы относятся к голарктическому подвиду и являются близко-

родственными, отличаясь друг от друга по гипервариабельному локусу Ft-M3.

Чувствительность к антибиотикам. Штаммы туляремии микроба, выделенные в Ханты-Мансийске, оказались устойчивыми к эритромицину, ампициллину и цефалоспорином, но чувствительными к амикацину (диаметр зоны подавления роста 28 мм), тетрациклину (56 мм), доксициклину (49 мм) и гентамицину (27 мм).

Бактериологический анализ биологического материала от людей и животных, взятого в разгар эпидемии в Ханты-Мансийске, позволил выделить чистые туляремиальные культуры, не прибегая к биологическому методу. Оказалось, что в содержимом пустулы живые бактерии сохраняются в течение не менее четырех дней с момента укуса насекомыми.

Выделенные штаммы туляремии микроба имеют, по данным MLVA-типирования, наибольшее эволюционное сродство к штаммам, циркулирующим на территории Казахстана и Челябинской области и отличаются от штаммов, типичных для сибирских очагов туляремии.

Так как туляремиальные культуры, выделенные в течение трех дней, имеют четыре разных MLVA-генотипа, можно предположить, что на территории Ханты-Мансийска и его окрестностей циркулировало несколько вариантов возбудителя туляремии.

Количество тандемных повторов в локусе Ft-M3 у штаммов *F. tularensis*, выделенных в Ханты-Мансийске

Штамм	Количество тандемных повторов в локусе Ft-M3
3	9
10	10
4	15
7	15
8K	15
8M	15
2/26	15
1/23	17
3/23	17
1/25	17

Обнаружение штаммов *F. tularensis* с одинаковым количеством повторов в Ft-M3 локусе как у человека, так и у буроzubки, может свидетельствовать об общем источнике заражения грызунов и людей. Природа резервуара инфекции остается невыясненной.

Штаммы *F. tularensis*, выделенные от заболевших туляремией пациентов во время эпидемии туляремии в округе, чувствительны к антибактериальным препаратам первого ряда. Проведенный анализ 32 историй болезни показал, что в 63 % случаев в лечении применялся амикацин.

С 1959 по 1992 год на территории 8 районов автономного округа из различных объектов окружающей среды получены 94 культуры возбудителя туляремии. Наибольшее количество культур выделено в Кондинском (33 культуры), Березовском и Октябрьском районах (по 20 культур). Более 50 % культур получили из образцов воды. От водяной полевки и ее экскрементов выделили 25 культур, от ондатры – 4, от обыкновенной буроzubки – 3 и по одной культуре от рыжей полевки и полевки-экономки, тогда как возбудитель туляремии у людей не выделен. К сожалению, все ранее полученные в округе культуры не были сохранены, что не позволяет сравнивать генотип культур, выделенных в 2013 г., с вариантами туляремийного микроба, циркулировавшими в этом регионе ранее.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 58 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; 107(1):46–8.
3. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории

Алтайского края. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 115(1):66–9.

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

5. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сальмонеллез, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. МУК 4.2.2495-09. М.; 2009.

6. 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.

References

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz; 1962. 58 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(1):46–8.
3. Mokrievich A.N., Timofeev V.S., Kudryavtseva T.Yu., Ulanova G.I., Karbysheva S.B., Mironova R.I., Vakhrameeva G.M., Gubareva T.I., Pavlov V.M., Dyatlov I.A. [Isolation of Central Asian subspecies of tularemia agent in the Altai Territory]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 115(1):66–9.
4. Olsuf'ev N.G. [Taxonomy, Microbiology, and Laboratory Diagnostics of Tularemia Agent]. M.: Meditsina; 1975. 192 p.
5. [Determination of sensitivity in dangerous bacterial infection agents (plague, anthrax, cholera, tularemia, brucellosis, glanders, melioidosis) to anti-bacterial preparations. Methodological regulations]. MR 4.2.2495-09. M.; 2009.
6. 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.

Authors:

Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Timofeev V.S., Mironova R.I., Kudryavtseva T.Yu., Kombarova T.I., Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org
Kozlova I.I., Shutko O.D., Kuznetsova T.S., Faizullina N.M. Center of Hygiene and Epidemiology in the Khanty-Mansiisk Autonomous District – Yugra. 72, Roznina St., Khanty-Mansiisk, 628011, Russian Federation

Об авторах:

Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Миронова Р.И., Кудрявцева Т.Ю., Комбарова Т.И., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org
Козлова И.И., Шутко О.Д., Кузнецова Т.С., Файзуллина Н.М. Центр гигиены и эпидемиологии в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре. Российская Федерация, 628011, г. Ханты-Мансийск, ул. Рознина, 72. E-mail: epid_fgu3@xmao.su

Поступила 10.02.15.