

# Молекулярно-биологическая идентификация туляремийного микроба

Сеничкина Айслу Мухамятовна, Осина Н.А., Абдрашитова А.С.

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Туляремия является природно-очаговым инфекционным антропонозом, вспышки и единичные случаи которого регистрируются ежегодно. Возбудитель туляремии - *Francisella tularensis* – циркулирует повсеместно среди мелких и крупных млекопитающих, в объектах окружающей среды. В соответствии с современной классификацией внутри вида *F. tularensis* выделяют четыре подвида: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*; голарктический подвид включает три биовара: *japonica*, эритромицинчувствительный (*Ery<sup>S</sup>*), эритромицинустойчивый (*Ery<sup>R</sup>*); подвид *tularensis* представлен двумя генетическими субпопуляциями: AI и AII. Для подвидов, биоваров и генетических групп туляремийного микроба характерны различные ареалы распространения. Патогенность туляремийного микроба напрямую зависит от того, к какому подвиду он относится. Наибольшей вирулентностью для человека обладает подвид *tularensis*. Подвиды *holarctica* и *mediasiatica* характеризуются меньшей вирулентностью, тогда как вирулентность подвида *novicida* для человека до конца не изучена. Поэтому на этапе идентификации штаммов возбудителя туляремии особое значение приобретают методы внутривидовой дифференциации *F. tularensis*.

Определение подвидов туляремийного микроба основано на выявлении различий в способности штаммов ферментировать глицерин, фосфатазу, цитруллин, чувствительности культур к пенициллину, их вирулентности для кроликов и на выявлении подвидоспецифичных участков генома патогена [Руководство по лабораторной диагностике опасных инфекционных болезней, 2013].

В настоящее время накоплено достаточное количество данных о применении молекулярно-биологических методов для идентификации туляремийного микроба. В соответствии с Руководством ВОЗ [WHO, 2007] для дифференциации подвидов туляремийного микроба применяют метод ПЦР, основанный на выявлении участков FT-M19, ISFtu2, RD1. В качестве препаратов для индикации и ускоренной внутривидовой идентификации возбудителя туляремии в пробах клинического, биологического материала и объектах окружающей среды разработаны наборы реагентов «Ген *Francisella tularensis* – РЭФ», «Ген *Francisella tularensis* – РФФ», «Ген *Francisella tularensis* – подвид - РЭФ», «Ген *Francisella tularensis* – подвид - РФФ» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), «ОМ-Скрин-Туляремия-РВ» (ЗАО «Синтол»). Для определения подвидов *F. tularensis* возможно применение методов однопраймерного ПЦР-типирования [Вахрамеева с соавт., 2011], секвенирования, MALDI-TOF масс-спектрометрии [Lundquist, 2005].

Однако каждая из представленных технологий имеет свои достоинства и недостатки. Сравнительная оценка методов представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика молекулярно-биологических методов внутривидовой дифференциации *F. tularensis*

Метод/Набор реагентов	Достоинства	Недостатки
«Ген <i>Francisella tularensis</i> – РЭФ»	1. Высокая чувствительность ( $1 \times 10^3$ м.к./мл) 2. Возможность обнаружения возбудителя в клиническом, биологическом материале, объектах окружающей среды 3. Не требуется использование дорогостоящего	1. Возможна только видовая индикация возбудителя

	высокотехнологичного оборудования импортного производства	
«Ген <i>Francisella tularensis</i> – РГФ»	1. Высокая чувствительность ( $1 \times 10^3$ м.к./мл) 2. Возможность обнаружения возбудителя в клиническом, биологическом материале, объектах окружающей среды	1. Требуется использование дорогостоящего высокотехнологичного оборудования импортного производства 2. Возможна только видовая индикация возбудителя
ПЦР-дифференциация с помощью участка RD-1	1. Возможность определения всех подвидов, японского биовара <i>F. tularensis</i> 2. Не требуется использование дорогостоящего высокотехнологичного оборудования импортного производства	1. Требуется чистая культура возбудителя 2. Низкая чувствительность ( $1 \times 10^7$ м.к./мл) 3. Особые условия амплификации и учета результатов анализа 4. Продолжительна по времени 5. Нет возможности определить субполяции
ПЦР-дифференциация с помощью мишени Ft-M19, ISFtu2	1. Не требуется использование дорогостоящего высокотехнологичного оборудования импортного производства	1. Определение голарктического подвида <i>F. tularensis</i> 2. Требуется чистая культура возбудителя 3. Низкая чувствительность ( $1 \times 10^7$ м.к./мл) 4. Продолжительна по времени
Дифференциация с помощью RAPD-ПЦР	1. Возможность определения всех подвидов, японского биовара <i>F. tularensis</i> 2. Не требуется использование дорогостоящего высокотехнологичного оборудования импортного производства	1. Требуется чистая культура возбудителя 2. Низкая чувствительность ( $1 \times 10^7$ м.к./мл) 3. Продолжительна по времени 4. Нет возможности определить субполяции
Дифференциация с помощью набора «Ген <i>Francisella tularensis</i> –подвид - РЭФ»	1. Высокая чувствительность ( $1 \times 10^3$ м.к./мл) 2. Возможность обнаружения возбудителя в клиническом, биологическом материале, объектах окружающей среды 3. Не требуется использование дорогостоящего высокотехнологичного оборудования импортного производства	1. Возможно определение только голарктического подвида <i>F. tularensis</i>
Дифференциация с помощью набора «Ген <i>Francisella tularensis</i> –подвид - РГФ»	1. Высокая чувствительность ( $1 \times 10^3$ м.к./мл) 2. Возможность обнаружения возбудителя в клиническом, биологическом материале, объектах окружающей среды	1. Требуется использование дорогостоящего высокотехнологичного оборудования импортного производства 2. Возможно определение только голарктического подвида <i>F. tularensis</i>
Дифференциация с помощью набора «ОМ-Скрин-	1. Высокая чувствительность ( $1 \times 10^3$ м.к./мл) 2. Возможность обнаружения	1. Требуется использование дорогостоящего высокотехнологичного

Туляремия-РВ»	возбудителя в клиническом, биологическом материале, объектах окружающей среды	оборудования 2. Возможно определение только <i>F. tularensis</i> подвид <i>tularensis</i>
MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ	1. Возможность определения всех подвидов <i>F. tularensis</i>	1. Требуется использование дорогостоящего высокотехнологичного оборудования импортного производства 2. Требуется чистая культура возбудителя

Таким образом, очевидна необходимость разработки комплексной схемы, обеспечивающей индикацию и полную идентификацию возбудителя туляремии в нативном материале и выделенных культурах *F. tularensis*.

Целью работы явилась оценка эффективности молекулярно-биологических методов внутривидовой дифференциации *F. tularensis* и создание на их основе единого алгоритма для идентификации туляремийного микроба.

Для этих целей нами был проведен ряд экспериментов по разработке мультилокусной ПЦР, направленной на обнаружение и подвидовую дифференциацию возбудителя туляремии.

На основании анализа нуклеотидной последовательности штаммов туляремийного микроба, представленных в базе данных NCBI GenBank, и литературных источников в качестве ДНК-мишеней были выбраны: локус FTT 1067c (гомолог FTM 0875-0876), имеющий делецию 19 п.н. у штаммов *F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica* Ery<sup>S/R</sup>, *F. tularensis novicida*, локус FTT 1670c, который встречается только у *F. tularensis tularensis* и *F. tularensis novicida*, локус FTT 1122, имеющий делецию размером 273 п.н. у *F. tularensis novicida*, локус FTW\_2084, содержащий вставку размером 198 п.н. у *F. tularensis tularensis* субпопуляции АП и *F. tularensis novicida*, локус ISFtu2, который имеет различное расположение в геноме *F. tularensis tularensis* и *F. tularensis holarctica*.

На основании нуклеотидной последовательности данных генов были подобраны олигонуклеотидные праймеры и зонды формата TaqMan. Для возможного осуществления реакции в мультилокусном формате в состав зондов введены флуоресцентные метки, регистрация которых осуществляется при различных длинах волн.

Для проведения исследований предложено объединить праймеры и зонды в две реакционные смеси, где при использовании PC-1 – амплифицируются мишени FTT 1122, FTT 1670c, FTT 1067c, а при применении PC-2 - FTW\_2084 и ISFtu2. Использование таких смесей позволит в полной мере осуществить внутривидовую дифференциацию туляремийного микроба (таблица 2).

Таблица 2. Схема идентификации туляремийного микроба с помощью разработанных мультилокусных ПЦР

Наименование PC	PC-1			PC-2	
	FAM	JOE	ROX	FAM	JOE
Канал детекции флуоресценции					
Наименование ДНК-мишени	FTT 1122	FTT 1670c	FTT 1067c	FTW_2084	ISFtu2
<i>F. tularensis tularensis</i> субпопуляция АI	+	+	-	-	-
<i>F. tularensis tularensis</i> субпопуляция АII	+	+	-	+	-
<i>F. tularensis holarctica</i> Ery <sup>S/R</sup>	+	-	-	-	+

<i>F. tularensis holarctica japonica</i>	+	-	+	-	+
<i>Francisella tularensis mediasiatica</i>	+	+	+	-	-
<i>F. tularensis novicida</i>	-	+	-	+	-

Чувствительность разработанной ПЦР составила  $1 \times 10^4$  м.к./мл, специфичность – 100 %. С помощью экспериментального набора нам удалось провести подвидовую дифференциацию штаммов возбудителя туляремии методом ПЦР-РВ.

Ранее было показано, что масс-спектры штаммов туляремиального микроба, полученные с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии, специфичны для каждого подвида патогена [Lundquist, 2005]. При исследовании нами репрезентативной выборки культур возбудителя туляремии из фонда ГКПБ «Микроб» в полной мере подтверждают возможность использования MALDI-TOF масс-спектрометрии для внутривидовой дифференциации штаммов *F. tularensis*.

Дополнительно была изучена возможность определения подвидов и субпопуляций возбудителя туляремии с помощью фрагментарного секвенирования. В качестве перспективной мишени для проведения такого анализа оказался ген *sdhA*, который содержал SNP, специфичные для подвидов и субпопуляций *F. tularensis*. Использование секвенирования в совокупности с определением варибельности RD-1 области позволяет в полной мере провести внутривидовую идентификацию возбудителя туляремии (таблица 3).

Таблица 3. Схема определения подвидов и субпопуляций *F. tularensis* с помощью анализа варибельных участков RD-1 области и нуклеотидной последовательности *sdhA* гена

Возбудитель	Варибельные нуклеотиды			Организация RD-1 области
	80	96	365	
<i>Francisella tularensis</i> подвид <i>tularensis</i> AI	a	c	t	-
<i>Francisella tularensis</i> подвид <i>tularensis</i> AII	g	c	t	-
<i>Francisella tularensis</i> подвид <i>mediasiatica</i>	g	t	t	68
<i>Francisella tularensis</i> подвид <i>holarctica</i> биовары <i>Ery<sup>S</sup></i> , <i>Ery<sup>R</sup></i>	g	c	t	598
<i>Francisella tularensis</i> подвид <i>holarctica</i> биовар <i>japonica</i>	g	c	c	389

Применение на разных этапах исследования методических приемов с соответствующей чувствительностью и разрешающей способностью обеспечивает верификацию результатов диагностики патогена в лабораториях различного уровня (таблица 4).

Таблица 4. Схема идентификации туляремиального микроба с помощью молекулярно-биологических методов

№ п/п	Метод/ препарат	Чувствительность, м.к./мл	Исследуемый материал	Уровень организации лабораторий
1	ПЦР-тест-системы	$1 \times 10^3$ $1 \times 10^4$	Нативный материал, выделенные культуры	Лаборатории территориального и регионального уровней
2	Дифференциация	$1 \times 10^7$	Выделенные	Центры индикации,

	подвидов с помощью RD-1, ISFtu2, Ft-M19, RAPD-ПЦР		культуры	Референс-центр
3	Секвенирование sdhA гена, MALDI-TOF масс-спектрометрия	$1 \times 10^7$	Выделенные культуры	Центр верификации диагностической деятельности

Таким образом, нами проведена оценка эффективности молекулярно-биологических подходов для идентификации штаммов *F. tularensis*, предложены новые подходы и разработана комплексная схема, позволяющая осуществлять внутривидовую дифференциацию туляремийного микроба в полном объеме.