

инфекционных маркеров отбраковывается 25,9% донорского материала. Определена возможность получения ложных результатов серологических исследований. Сформулированы основные пути повышения инфекционной безопасности при операциях пересадки трупной роговицы.

Ключевые слова: кератопластика, доноры трупной роговицы, серологическая диагностика, маркеры ВИЧ, вирусов парентеральных гепатитов.

INFECTIOUS SAFETY OF DONOR'S TISSUES IN THE EYE MICRO-SURGERY

S.O. Rykov¹, L.T. Rogotska¹, V.R. Shaginian², T.A. Sergeyeva²

¹Kiev city clinical ophthalmological hospital "Center of the eye micro-surgery"

²SI "The L.V. Gromashevsky Institute of epidemiology and infectious diseases of NAMS of Ukraine", Kyiv

The analysis of the results of serological researches for the markers of HIV, HBV and HCV infection of the samples of the cadaver cornea donor's blood serum is carried out. It is shown that 25,9% of donor material are discarded because of the infectious marker's detection. The possibility of obtaining the false results of serological studies is determined. The basic ways of infectious safety's increasing with the operations of the transplantation of the cadaver cornea are formulated.

Key words: keratoplasty, donor cadaver corneas, serologic diagnosis, markers of HIV virus parenteral hepatitis.

Рецензент: к.б.н. О.В. Максименко

УДК 579.841.95:57.053.8(477.7)

А.Г. Стопчанская, Н.Б. Пархоменко, Г.Н. Джуртубаева, Н.В. Пилипенко, О.А. Захарова, Н.Б. Выдайко

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ И ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ШТАММОВ *FRANCISELLA TULARENSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В УКРАИНЕ

ГУ "Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И.И. Мечникова", Одесса

Установлено генотипическое разнообразие популяции туляремийных бактерий, циркулирующих в Украине, идентифицировано 9 генотипов с уникальными аллелями VNTR-локусов, большая гетерогенность генотипов выявлена в активных природных очагах туляремии (Полесье). Филогенетический анализ подтвердил изменчивость возбудителя в зависимости от географической зоны и видовой принадлежности хозяина. Механизмами высокой вирулентности возбудителя туляремии являются авидность токсических компонентов к мембранным структурам и хроматину клеток-мишеней, использование двух стратегий расселения, модуляция биологии клеток-мишеней.

Ключевые слова: туляремия, молекулярное типирование, вирулентность, экология.

Туляремия является одной из наиболее распространенных зоонозных инфекций [4]. В последние два десятилетия, после периода относительного благополучия (1950–1990 гг.), произошла активизация эпидемического процесса туляремии. Крупные вспышки и спорадические случаи регистрируются не только в эндемичных регионах (Швеция, Финляндия, Россия), но и на новых (Испания) географических территориях [12]. Следует подчеркнуть, что причины и механизмы активизации эпидемического процесса в конце XX и начале XXI столетий не ясны. Среди причин реанимации природных очагов туляремии и возникновения новых обсуждается возможность изменения молекулярно-биологических свойств возбудителя и/или хозяина [1].

Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о значительных вариациях состава

© А.Г. Стопчанская, Н.Б. Пархоменко, Г.Н. Джуртубаева, Н.В. Пилипенко, О.А. Захарова, Н.Б. Выдайко

аллелей VNTR-локусов (variable-number tandem repeat) штаммов *F. tularensis*, однако, биологический смысл модуляции числа tandemных повторов отдельных локусов неизвестен [1, 8, 9, 14].

Цель работы — изучить генотипическую структуру и фенотипические проявления вирулентности для человека штаммов *F. tularensis*, изолированных в различных ландшафтно-географических зонах Украины от клещей, грызунов, человека и из воды.

Материалы и методы

Исследованы штаммы *F. tularensis*, изолированные в зоне Степи (8 штаммов) и Полесья (14 штаммов). Все штаммы по культурально-морфологическим, биохимическим свойствам и результатам молекулярно-биологического исследования были идентифицированы как представители подвида *F. tularensis holarctica*.

Аллельные вариации 25 VNTR-локусов с идентифицированными нуклеотидными последовательностями и расположением в геноме исследованы в рамках международного научного сотрудничества в референс-лаборатории департамента клинической микробиологии, Швеция. Вариабельность VNTR-локусов оценивали при помощи индекса разнообразия Нея [11]. Генотип индивидуального штамма выражали через аллели 4-х вариабельных VNTR-локусов. Анализ относительных генетических дистанций и кластеризацию генотипов проводили в программе Trees (Украина) методом UPOMA [2, 7]. Структурно-функциональные изменения клеток иммунной системы и естественной резистент-

ности клеток периферической крови человека (ПКЧ) здоровых доноров под влиянием штаммов различных генотипов исследованы, как описано (пат. № 37715), [3].

Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ генотипической структуры индивидуальных изолятов позволил идентифицировать 4 полиморфных VNTR-локуса (Ft-M3, Ft-M6, Ft-M20 и Ft-M24) и выявить делецию 30 базовых пар нуклеотидов в локусе Ft-M19 у всех исследованных штаммов, что характерно для субвида *F. tularensis holarctica*.

По аллельному профилю четырех полиморфных локусов идентифицировано 10 уникальных генотипов, в том числе 1 генотип, представленный вакцинным штаммом 15 и его SR- и R-вариантами (таблица).

Генотипическое разнообразие штаммов *F. tularensis* выше в зоне природных очагов Полесья (6 уникальных генотипов) по сравнению с таковой зоны Степи (3 уникальных генотипа), что указывает на роль экологических факторов в поддержании генотипической гетерогенности популяции туляремийного микроба и на более интенсивные внутривидовые связи в природных очагах Полесья. Отсутствие идентичных генотипов в географически удаленных зонах свидетельствует об автономности этих природных очагов и о географической изменчивости возбудителя.

Сравнительный анализ аллельных профилей генотипов показал, что наибольший вклад в генотипическое разнообразие штаммов вносит локус

Таблица. Характеристика циркулирующих в Украине генотипов штаммов *Francisella tularensis holarctica*

Генотип	Источник выделения	Кратность повторов VNTR локусов				
		Ft — M3	Ft — M6	Ft — M19	Ft — M20	Ft — M24
1	вакцинный штамм	16	4	0	4	2
2	человек	28	4	0	3	2
3	вода	19	4	0	3	2
4	вода	9	4	0	3	2
5	грызуны	25	4+6	0	3	1
6	клещи	17	5	0	3	2
7	клещи	22	4	0	3	2
8	клещи	18	5	0	3	2
9	клещи	10	5+6	0	3	2
10	клещи	16+17	5	0	3	2

Ft—M3, который, вероятно, выполняет определенную функцию в процессе адаптации патогена к условиям выживания. Полученные результаты соответствуют данным [8], исследовавших коллекцию штаммов из различных регионов мира. Высокая вариабельность локуса Ft — M3 была отмечена при исследовании 20 штаммов *F. tularensis*, изолированных в различных географических областях Китая [16].

Таким образом, на территории Украины циркулирует гетерогенная популяция туляремиальных микробов, имеется тенденция к родству штаммов в зависимости от видовой принадлежности хозяина и географического происхождения. Можно полагать, что генотипическая структура штаммов *F. tularensis* отражает эпидемическую ситуацию в природном очаге.

Проведенный нами филогенетический анализ подтвердил суммарное влияние видовой принадлежности хозяина и территориальной приуроченности на процессы микроэволюции при формировании генотипа. Подобные свойства возбудителя *F. tularensis* были выявлены и другими исследователями [6, 13].

Можно полагать, что аллельные вариации полиморфных VNTR-локусов лежат в основе возникновения и поддержания генотипического разнообразия штаммов туляремиальных микробов, их микроэволюционных изменений при сохранении структуры кодируемых областей генома, что подтверждается локализацией полиморфных локусов (Ft — M3, Ft — M6, Ft — M20) в пределах открытой рамки считывания [4]. В связи с этим представлялось важным установить, оказывает ли генотипически обусловленная адаптация туляремиальных микробов данного штамма к определенному хозяину и/или экологической нише, влияние на его вирулентные свойства для человека.

Детальное изучение последовательных этапов взаимодействия туляремиальных микробов различных генотипов с клетками иммунной системы и естественной резистентности ПКЧ показали, что главной клеткой-мишенью для всех изученных генотипов природных штаммов является моноцит-макрофаг. В то же время, сроки развития и интенсивность цитодеструктивных изменений этих клеток, в определенной мере, зависели от генотипа штамма.

Под влиянием природных изолятов спустя 2–4–8 часов наблюдали набухание ядер и локальную, а затем диффузную деструкцию ядерного хроматина. Многие моноциты-макрофаги образуют разное число цитоплазматических отростков-тя-

жей, с которыми ассоциированы туляремиальные микробы. Процесс репродукции возбудителя в моноцитах-макрофагах завершается резким увеличением размеров ядер, их полным разрушением (рис. 1). Цитоплазма становится бесструктурной и обширной, содержит туляремиальные микробы, чаще попарно расположенные в вакуолях, среди бесструктурных фрагментов цитоплазмы или внеклеточно (2 тип расселения). Длительное сохранение туляремиальных бактерий в цитозоле и её фрагментах является, очевидно, одним из механизмов выживания патогена в среде, содержащей многочисленные медиаторы воспаления.

Поскольку сроки развития цитодеструктивных процессов совпадали с периодом внутриклеточной репродукции возбудителя, очевидно, что повреж-

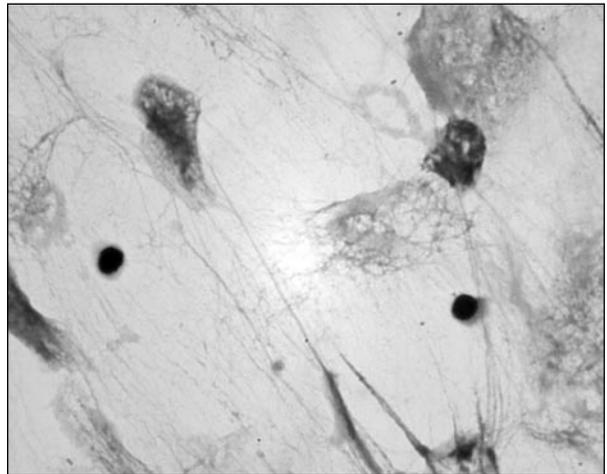


Рисунок 1. Деструкция ядерного хроматина и цитоплазмы макрофагов, зараженных шт. 29 8 генотипа. Окраска по Романовскому-Гимза, 1200х.

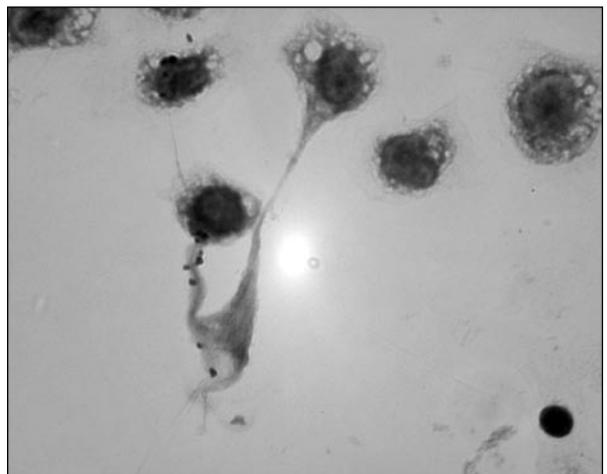


Рисунок 2. Межклеточное расселение туляремиальных микробов. Окраска по Романовскому-Гимза, 1200х.

дения клеток обусловлены действием токсических субстанций, синтезируемых возбудителем. Главными мишенями для этих биологических активных молекул являются клеточные мембраны и ядерный хроматин. В результате дестабилизации клеточных мембран формируются цитоплазматические тяжи, часто ассоциированные с туляремийными бактериями (рис. 2) и контактирующие с соседними клетками, обеспечивая раннее межклеточное расселение возбудителя (1 стратегия). Вследствие повышения проницаемости мембранных структур токсические молекулы проникают в другие типы клеток и индуцируют апоптоз, что снижает их защитный потенциал и может обуславливать поздний антительный ответ у больных туляремией.

Показано, что скорость и интенсивность деструкции моноцитов-макрофагов коррелирует с темпом и интенсивностью репродукции туляремийных бактерий, а скорость развития и завершенность апоптоза нейтрофилов отражает интенсивность синтеза токсических молекул и является одним из наиболее демонстративных критериев оценки вирулентности штаммов *F. tularensis* (рис. 3). Подтверждением тому служат недавно полученные данные [10] о продукции *F. tularensis* везикул наружной мембраны и тубулоподобных структур, которые секретируются во внешнюю среду и присутствуют на поверхности туляремийных микробов. И, хотя функции указанных структур не установлены, некоторые белки, идентифицированные как везикуло-ассоциированные, важны для вирулентности *Francisella*. Авторы полагают, что в продукции везикул и тубулоподобных структур участвуют гены, ассоциированные с биогене-

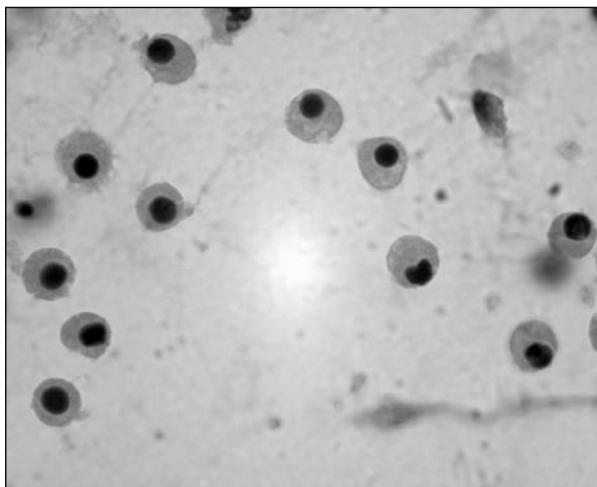


Рисунок 3. Апоптоз нейтрофилов ПКЧ, зараженных шт. 56 3 генотипа. Окраска гематоксилин-эозином, 1200х.

зом пилей адгезии IV типа. Вполне вероятно, что именно белки, связанные с указанными пилиями, являются теми токсическими молекулами, которые вызывают повреждения мембранных структур клеток-мишеней, в том числе клеток естественной резистентности [10].

Результаты проведенных нами экспериментов показали, что наиболее ранние (2–4 часа) и тяжелые повреждения моноцитов-макрофагов наблюдали при заражении культур ПКЧ штаммами 6, 8 и 10 генотипов, изолированных от иксодовых клещей. Для штаммов этих генотипов был характерен также наиболее высокий темп репродукции возбудителя и повреждения нейтрофилов. Близкую картину цитопатологических изменений наблюдали при заражении клеток ПКЧ штаммами *F. tularensis* 3 генотипа, выделенными из воды.

Более разнообразными были фенотипические проявления факторов вирулентности 3 изолятов второго генотипа, полученных от человека. Указанные штаммы различались по срокам развития цитопатического эффекта, степени тяжести повреждений моноцитов-макрофагов и нейтрофилов, интенсивности размножения возбудителя. Низкая вирулентность одного из штаммов *F. tularensis*, изолированного от больного туляремией с легким течением заболевания, наиболее вероятно связана не с вариациями VNTR-локусов, которые были идентичны таковым у двух других высоко-вирулентных клинических изолятов от больных с тяжелым течением заболевания, а с делецией в областях различий RD 18 и/или RD 19, гены которых кодируют ряд белков, ответственных за вирулентность. Делеции в указанных областях были выявлены [15] у 2-х из 10-ти изолятов от человека.

Выводы:

1. Впервые установлено генотипическое разнообразие популяции туляремийных микробов, циркулирующей в Украине. Идентифицировано 9 генотипов. Аллельный профиль VNTR-локусов является уникальной характеристикой штаммов *F. tularensis*, наибольшим полиморфизмом обладает локус Ft-M3. Генотипическая структура штаммов *F. tularensis* может отражать эпидемическую ситуацию в природном очаге.

2. Число ДНК-маркеров для генотипирования штаммов *F. tularensis* может быть ограничено четырьмя полиморфными VNTR-локусами (Ft-M3, Ft-M6, Ft-M20 и Ft-M24) без снижения дискриминационной способности системы типирования.

3. Прослеживается связь генотипа с географическим происхождением и видовой принадлежностью хозяина штаммов *F. tularensis*, что подтверждается результатами филогенетического анализа.

4. Структура популяции туляремийных микробов в природных очагах юга зоны Степи и Полесья неодинакова, большее разнообразие генотипов выявлено в природных очагах Полесья, что может отражать более интенсивные внутривидовые связи возбудителя.

5. Все природные штаммы *F. tularensis* размножаются в моноцитах-макрофагах человека, независимо от источника выделения и генотипа. В процессе внутриклеточной репродукции вирулентные штаммы синтезируют и секретируют токсические компоненты, мишенью для которых являются мембраны и ядерный хроматин клеток иммунной системы и естественной резистентно-

сти. Апоптоз нейтрофилов является индикатором интенсивности синтеза токсических молекул и может быть использован в качестве критерия оценки вирулентности.

6. Наиболее значимыми механизмами высокой вирулентности возбудителя туляремии являются высокая авидность его токсических компонентов к мембранным структурам и хроматину клеток иммунной системы и естественной резистентности человека, использование возбудителем двух стратегий расселения.

Перспективы дальнейших исследований связаны с использованием мультилокусного VNTR-анализа для генотипирования штаммов *F. tularensis* с целью изучения филогенеза возбудителя туляремии, оценки эпидемического потенциала природного очага и прогнозирования эпидемической ситуации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Водопьянов А.С. VNTR-генотипирование штаммов *Francisella tularensis*, выделенных на территории бывшего СССР и некоторых стран Европы во время эпизоотий 1988–1989 годов / А.С. Водопьянов, Б.Н. Мишанькин, Н.В. Павлович, С.О. Водопьянов, И.Ю. Сучков, Н.Л. Пичурина, Ю.И. Арутюнов // Журн. микробиол. — 2006. — № 3. — С. 22–27.
2. Календарь Р.Н. Компьютерная программа “WMAP_QTL” для генетических исследований / Р.Н. Календарь, Ю.М. Сиволап // Тезисы докладов международной конференции “Агробиотехнология растений и животных”. — Киев, 29–30 мая, 1997. — С. 19–20.
3. Пат. С12Q 1/00G 01N33/53 Спосіб визначення патогенності штамів *F. tularensis in vitro* / А.Г. Стопчанська, Н.Б. Пархоменко, Н.В. Пилипенко, Г.М. Джуртубаєва, Л.С. Костюченко. Заявник: Український НДПЧ ім. І.І. Мечнікова МОЗ України — № 37715. — заявлений 27.05.2008. — опублікований 10.12.2008. — Бюл. № 23.
4. Стопчанская А.Г. Генотипирование штаммов туляремийных микробов выделенных в различных ландшафтно-географических зонах Украины / Н.Б. Пархоменко, Г.Н. Джуртубаева, Н.В. Пилипенко // VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием “Молекулярная диагностика — 2010”, 24–26 ноября 2010 г. — М. — С. 428–431.
5. Farlow J. *Francisella tularensis* in the United States / J. Farlow, D.M. Wagner, M. Dukerich, M. Stanley, May Chu., K. Kubota, J. Petersen, P. Keim // Emerg. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 11, № 12. — P. 1835–1841.
6. Goethert H.K. Genotypic Diversity of tularensis Infecting Dermacentor variabilis Ticks on Martha’s Vineyard, Massachusetts / H.K. Goethert, I. Shani, S.R. Telford // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42, № 11. — P. 4968–4973.
7. Hunter P. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson’s index of diversity / P. Hunter, M.A. Gaston // J. Clin. Microbiol. — 1988. — Vol. 26. — P. 2465–2466.
8. Johansson A. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by Multiple-locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis / A. Johansson, J. Farlow, P. Larsson // J. Bacteriol. — 2004. — Vol. 186, № 17. — P. 5808–5818.
9. Larsson P. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia / P. Larsson, P.C.F. Oyston, P. Chain [et al.] // Nat. Genet. — 2005. — Vol. 37, № 2. — P. 153–159.
10. McCaig W.D., Production of membrane vesicles and tube-like structures by *Francisella tularensis* / W.D. McCaig, D.G. Thanassi // 6th International Conference on Tularemia 13–16 September 2009, Berlin, Germany Charite Campus Mitte (CCM). — P. 1–08. — P. 46.
11. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations / M. Nei // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1973. — Vol. 70, № 12. — P. 3321–3323.
12. Petersen J.M. Tularemia: emergence/re-emergence / J.M. Petersen, M.E. Schrieffer // Vet. Res. — 2005. — Vol. 36, № 3. — P. 455–467.
13. Puente-Redondo de la V.A., Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains / V.A. de la Puente-Redondo, N. Garcia del Blanco, C.B. Gutierrez-Martin, F.G. Garcia-Pena, E.F. Rodriguez Ferri // Clin. Microbiol. — 2000. — Vol. 38, № 3. — P. 1016–1022.
14. Svensson K. Evolution of Subspecies of *Francisella tularensis* / K. Svensson, P. Larsson, D. Johansson, M. Bystrom [et al.] // J. Bacteriol. — 2005. Vol. 187, № 11. — P. 3903–3908.
15. Svensson K. Genetic Genealogy and Epidemiology of *Francisella*. Document name Doctoral dissertation: date of issue 15 May 2009 / Kerstin Svensson. // Umea, 2009. — 47 p.
16. Zhang F. Development of a multiple-locus Variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for Chinese *Francisella tularensis* and its application to some strains / F. Zhang, W. Lui, J. He, Q. Duan, W. Cao // 6th International Conference on Tularemia 13–16 September 2009, Berlin, Germany Charite Campus Mitte (CCM). — P. 2–11. — P. 109.

**ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ГЕНОТИПІЧНОЇ СТРУКТУРИ ТА ФЕНОТИПІЧНИХ ПРОЯВІВ ВІРУЛЕНТНОСТІ
ДЛЯ ЛЮДИНИ ШТАМІВ *FRANCISELLA TULARENSIS*, ЦИРКУЛЮЮЧИХ В УКРАЇНІ**

А.Г. Стопчанська, Н.Б. Пархоменко, Г.Н. Джуртубаєва, Н.В. Пилипенко, О.А. Захарова, Н.Б. Видайко
ДУ “Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечнікова”, Одеса

Встановлено фенотипічне різноманіття популяції туляремійних бактерій, циркулюючих в Україні, ідентифіковано 9 генотипів з унікальними алелями VNTR-локусів, більша гетерогенність генотипів виявлена в активних природних осередках туляремії (Полісся). Філогенетичний аналіз підтвердив залежність мінливості збудника від географічної зони та видової приналежності хазяїна. Механізмами, що впливають на високу вірулентність збудника туляремії, є авідність токсичних компонентів до мембранних структур і хроматину клітин-мішеней, використання збудником двох стратегій розселення, модуляція біології клітин-мішеней.

Ключові слова: туляремія, молекулярне типування, вірулентність, екологія.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE GENOTYPIC STRUCTURE AND PHENOTYPIC SIGNS OF VIRULENCE
FOR HUMAN STRAIN OF *FRANCISELLA TULARENSIS*, CIRCULATING IN UKRAINE**

A.G. Stopchanskay, N.B. Parkhomenko, G.M. Djurtubaeva, N.V. Pilipenko, O.A. Zakharova, N.B. Vydayko
SI “I.I. Mechnikov Ukrainian Antiplague Research Institute”, Odessa, Ukraine

Genotype diversity of the tularemia bacteria population circulating in Ukraine was established, nine genotypes with unique alleles of VNTR-loci were identified, a large heterogeneity of genotypes was detected in active natural foci of tularemia (Polessie). Phylogenetic analysis confirmed the geographical and the host variability of the pathogen. The mechanisms of the high virulence of tularemia are the avidity of toxic components to membrane structures and chromatin of target cells, the use of two strategies for resettlement, the modulation biology of target cells.

Key words: tularemia, molecular typing, virulence, and ecology.

Рецензент: к.м.н. Л.С. Красюк
