

УДК 616.995.121-092 : 612.118.221.2.017.: 575

**ГЕНОМНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ИЗОЛЯТОВ  
ECHINOCOCCUS GRANULOSUS  
ИЗ РАЙОНОВ ЮЖНОГО УРАЛА**

© Г. И. Лукманова, А. А. Гумеров, М. М. Туйгунов, Т. В. Викторова

Эхинококкоз продолжает оставаться серьезной медицинской проблемой на Южном Урале в связи с ростом количества больных цистным гидатидозом в последнее десятилетие. Нами изучены 9 ларвоцист *Echinococcus granulosus*, полученных от 9 пациентов (в возрасте 7—14 лет), оперированных по поводу эхинококкоза в клинике кафедры детской хирургии Башкирского государственного медицинского университета в 2003 г., и 1 циста, полученная от естественно инвазированного крупного рогатого скота. При гистологическом исследовании стенки кисты во всех образцах определялась характерная для эхинококковых пузырей слоистая хитиновая оболочка, изнутри выстланная герминативным слоем. Для идентификации штаммов *E. granulosus* было проведено геномное типирование методом оценки полиморфизма длин рестрикционных фрагментов продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР-ПДРФ). В качестве ДНК маркера использовали фрагмент митохондриального гена, кодирующего первую субъединицу цитохром-С-оксидазы (COI). Сравнительный анализ полученных результатов показал, что все образцы ДНК имеют генотип *E. granulosus* G1 (общий, штамм домашних овец).

За последние годы количество больных эхинококкозом в районах южного Урала, Предуралья и Зауралья Республики Башкортостан (РБ) заметно увеличилось (Гафурова и др., 1996; Гумеров и др., 2000; Шангареева и др., 2004). На территории РБ случаи заболевания эхинококкозом людей зарегистрированы в 43 районах из 54 и в 17 городах из 20 (Хазиев и др., 2002). Широкое распространение эхинококкоза среди населения РБ в значительной мере обусловлено относительно сильным заражением животных. Зараженность главных хозяев установлена у 20.4 % приотарных, 18.9 бродячих, 7.4 дворовых и 5.8 % охотничьих собак. Среди промежуточных хозяев эхинококкоз наиболее распространен в РБ у овец (11.5 %), затем у крупного рогатого скота (7.4) и у свиней (1.7) (Сулейманова, 2003).

На территории России зарегистрировано 2 вида цестод рода *Echinococcus* — *E. granulosus* и *E. multilocularis*, вызывающие соответственно цистный эхинококкоз и гидатидоз и альвеолярный эхинококкоз и гидатидоз. Более распространен в России вид *E. granulosus* (Бессонов, 2001). В настоящее время известно, что внутри вида *E. granulosus* существуют подвиды (штаммы), отличающиеся своими морфологическими, иммунологическими, биологическими и инвазионными свойствами (Thompson, 1999; Smyth, Smyth,

1964), которые хорошо коррелируют с генетическими особенностями. Попытки идентификации штаммов только по морфологическим или биологическим свойствам часто дают неоднозначный результат и не всегда возможны, поэтому в последнее время для изучения внутривидовой вариативности *E. granulosus* больше используют характеристику генетического полиморфизма (Thompson, 1978, 1988, 1999; Bowles et al., 1992, 1995; Бессонов, 2001; Rosenzvit et al., 2001; Перчун, 2002). В качестве ДНК маркеров для генотипирования *E. granulosus* применяют фрагменты митохондриальных генов цитохром-С-оксидазы субъединица 1 (CO1), NADH-дегидрогеназы субъединица 1 (ND1) и фрагмент ядерного рибосомного гена — внутренний транскрибирующий спейсер субъединица 1 (ITS1) (Bowles et al., 1992, 1995; Rosenzvit et al., 2001). На основе сравнительного изучения структуры митохондриальных генов, кодирующих CO1 и ND1, было показано существование на планете 9 генотипов *E. granulosus*: G1 — общий, штамм домашних овец, G2 — штамм Тасманских овец, G3 — штамм буйволов, G4 — штамм лошадей, G5 — штамм крупного рогатого скота, G6 — штамм верблюдов, G7 — штамм свиней, G8 — штамм северных оленей, G9 — обнаружен у людей в Польше. Изучение генетических особенностей изолятов *E. granulosus*, циркулирующих на территории России, Молдовы и Республики Казахстан (Никулина, 2003; Никулина и др., 2003) показало, что в этих регионах распространены штаммы G1, G2, G5, G6, G7. Наиболее часто встречаются G1, G6, G7.

Настоящая работа посвящена определению штаммовой принадлежности генотипов *Echinococcus granulosus*, циркулирующих на территории южного Урала, Предуралья и Зауралья Республики Башкортостан.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Нами изучены кисты, полученные от 9 детей, оперированных по поводу эхинококкоза печени (6 пациентов), эхинококкоза легких (3 пациента) в клинике кафедры детской хирургии Башкирского государственного медицинского университета в 2003 г.

4 пациента поступили на лечение из районов Предуралья (западная часть РБ), 1 — из Южного Урала (горная часть) и 4 — из Зауралья (восточная часть) (см. рисунок). Возраст пациентов — 7—14 лет. Мальчиков среди пациентов было 5, девочек — 4. 5 детей поступили первично, 4 были оперированы ранее по поводу эхинококкоза печени (2 пациента), легкого (2 пациента). Считают себя больными от 1 мес. до 3 мес. — 1 ребенок; от 3 мес. до 1 года — 4; более 1.5 лет — 4. На лечение поступили в начальной стадии болезни 1 ребенок (стертость клинической картины, отсутствие локальных жалоб), во второй стадии — 8 (боли в животе, локальная симптоматика).

Нами изучена 1 циста, полученная из Абзелиловского р-на (Зауралье РБ) от естественно инвазированного убойного крупного рогатого скота (одной трехгодовалой коровы).

Микроскопическое исследование. Для микроскопического исследования брали кусочки оболочки материнских эхинококковых пузырей. Материал обрабатывали по общепринятой методике, гистологическим препаратом и окрашивали гематоксилин-эозином по Ван-Гизону.

Подготовка и хранение материала для молекулярно-генетических исследований. Молекулярно-генетические исследования проводились в соответствии с рекомендациями Никулиной и др. (2003).



Распространение генотипов *E. granulosus* на территории Республики Башкортостан.

G1 — название генотипов (штаммов): а — у человека, б — у крупного рогатого скота.

Distribution of the *Echinococcus granulosus* genotypes in the territory of Bashkortostan.

Эхинококковые пузыри хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для выделения ДНК брали фрагмент герминативной оболочки (2—3 грамма), промывали 3 раза в 3 объемах физраствора, замораживали жидким азотом и растирали в фарфоровой ступке. Растертую ткань суспендировали в 1 мл буфера TE. Выделяли ДНК (с протеиназой K). Депротеинизацию и осаждение ДНК осуществляли стандартным фенол-хлороформным методом.

Геномное типирование. Для геномного типирования применили метод оценки полиморфизма длин рестрикционных фрагментов продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР-ПДРФ). В качестве ДНК маркера использовали фрагмент митохондриального гена, кодирующего первую субъединицу цитохром-С-оксидазы (COI). Полученные продукты ПЦР подвергали гидролизу специфическими эндонуклеазами. Для этого использовали коммерческие препараты рестриктаз FokI, Sfa N1, MaeI (в соответствии с рекомендациями фирм производителей).

Электрофоретический анализ длин рестрикционных фрагментов проводили в 10%-ном полиакриламидном геле. В качестве маркера молекулярных масс использовали фрагменты ДНК плазмиды pUC 19/MspI.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При гистологическом исследовании стенки кисты во всех образцах определялась характерная для эхинококковых пузырей слоистая хитиновая оболочка, изнутри прилежащий герминативный слой. В результате проведенной микроскопии мы наблюдали в ларвоцистах выводковые капсулы с молодыми протосколексами и зрелые протосколексы.

Эхинококковые пузыри (9 образцов), выделенные от 9 людей (постоперационный материал), имели: у 1 пациента — малые (диаметром 50 мм), у 5 — средние (60—100 мм) и у 3 — большие (100—200 мм) размеры. 5 кист содержали в полости дочерние пузырьки. Киста (1 образец), выделенная от крупного рогатого скота (одной коровы), имела малый размер (45 мм).

Для идентификации штаммов *E. granulosus* было проведено геномное типирование с помощью метода ПЦР-ПДРФ. От всех из использованных в работе образцов ДНК *E. granulosus* получили амплификаты фрагмента митохондриального гена COI. Амплифицированные ДНК подвергли рестрикционному гидролизу.

Электрофоретический анализ рестрикционных фрагментов, полученных при помощи рестриктазы FokI, показал наличие во всех образцах продуктов рестрикции размерами 230 и 184 п. н., такая длина фрагментов характерна только для группы генотипов G1, G2 и G3. Анализ длин рестрикционных фрагментов, полученных при помощи рестриктазы Sfa N1, показал наличие во всех образцах продуктов рестрикции размерами 348 и 66 п. н. Фрагменты такой длины возникают только у генотипов, характерных для G1 — общий, штамм домашних овец и G3 — штамм буйволов. Для разделения генотипов G1 и G3 использовали рестриктазу MaeI. Электрофоретический анализ рестрикционных фрагментов, полученных при помощи MaeI, показал наличие фрагментов ДНК длиной 414 п. н. Фрагменты такой длины не возникают у генотипов, характерных для штамма G3. Сравнительный анализ результатов (длин фрагментов ДНК, полученных при помощи рестриктаз FokI, Sfa N1, MaeI) показал, что все образцы ДНК *E. granulosus*, изученные нами с использованием метода ПЦР-ПДРФ, идентифицировались как генотипы G1 — общий, штамм домашних овец.

Таким образом, при изучении штаммовой принадлежности *E. granulosus* установлено, что на территории южного Урала, Предуралья и Зауралья Республики Башкортостан циркулирует штамм с генотипом G1 (общий, штамм домашних овец), вызывающий цистный гидатидоз у детей и крупного рогатого скота.

#### Список литературы

- Бессонов А. С. Эхинококкозы в Российской Федерации // Мед. паразитол. 2001. № 3. С. 56—61.
- Гафурова З. М., Дарченкова Н. Н., Старкова Т. В. Распространение гидатидозного эхинококкоза среди населения Республики Башкортостан // Мед. паразитол. 1996. № 3. С. 45—47.
- Гумеров А. А. и др. Видеолапароскопическая эхинококкэктомия печени у детей // Матер. Междунар. науч.-практич. конф. «Проблемы эхинококкоза». Махачкала, 2000. С. 44—45.
- Никулина Н. А. Геномное типирование изолятов *E. granulosus* из разных регионов России: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2003. 26 с.
- Никулина Н. А., Бенедиктов И. И., Гараев М. М. Применение метода оценки полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ПЦР для типирования *E. granulosus* // Мед. паразитол. 2003. № 2, С. 29—32.
- Перчун Н. И. Экспериментальные модели эхинококкозов: характеристика изолятов возбудителей и химиотерапия имагинального альвеолярного эхинококкоза: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2002. 24 с.
- Сулейманова Г. Ф. Распространенность и меры борьбы с эхинококкозом в Республике Башкортостан // Матер. междунар. науч. практич. конф. «Пути повышения эффективности АПК в условиях вступления России в ВТО». М., 2003. С. 185.
- Хазиев Г. З., Сагитова А. С., Гайнулина И. Р., Шангареева Р. Х. Распространенность эхинококкоза в Башкортостане // Матер. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями (зоонозы)». М.: ВИГИС, 2002. Вып. 3. С. 352.
- Шангареева Р. Х., Гумеров А. А., Ишимов Ш. С. Современный подход к хирургическому лечению эхинококкоза у детей // Тр. IV Междунар. науч. конф. «Современные проблемы общей, медицинской и ветеринарной паразитологии». Витебск, 2004. С. 180.
- Bowles J., Blair D., McManus D. R. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing // Mol. Biochem. Parasitol. 1992. Vol. 54, N 2. P. 165—173.
- Bowles J., Blair D., McManus D. R. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* // Parasitology. 1995. Vol. 110. P. 317—328.
- Rosenzvit M. C. et al. *Echinococcus granulosus*: intraspecific genetic variacion assessed by a DNA repetitive element // Parasitology. 2001. Vol. 123. P. 381—388.
- Thompson R. C. A. Aspect of speciation in *Echinococcus granulosus* // Vet. Parasitol. 1978. Vol. 4. P. 93—98.
- Thompson R. C. A., Lymbery A. J. The nature, extent and significans of variacion within the genus *Echinococcus* // Adv. Parasitol. 1988. Vol. 27. P. 209—258.
- Thompson R. C. A. The importans of taxonomy in echinococcosis // XIX Int. Congres of Hydatidology. Argentina, 1999. P. 137—145.
- Smyth J. D., Smyth M. M. Natural and experimental hosts of *Echinococcus granulosus* with comments on the genetics of speciation in the genus *Echinococcus* // Parasitology. 1964. Vol. 54. P. 493—514.

Башкирский государственный медицинский университет,  
Уфа

Поступила 24 XII 2004

GENOMIC TYPING  
OF THE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS ISOLATES  
FROM THE AREAS OF SOUTHERN URALS

G. I. Lukmanova, A. A. Gumerov, M. M. Tuygunov, T. V. Viktorova

*Key words:* *Echinococcus granulosus*, Southern Urals, genomic typing.

SUMMARY

Nine larvocysts of *Echinococcus granulosus* isolated from nine patients and one cyst derived from a naturally infested cattle have been examined. Genomic typing was carried out in order to identify strains of *E. granulosus*. All DNA samples were shown to have the same genotype, *E. granulosus* G1.

---