

*К.А.Никифоров, Е.Г.Оглодин, Л.М.Куклева, Г.А.Ерошенко,
В.Г.Германчук, З.Л.Девдариани, В.В.Кутырев*

ПОДВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Цель. Разработка способа дифференциации штаммов *Y.pestis* разных подвидов на основе метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. *Материалы и методы.* Поиск ДНК мишеней для дифференциации подвидов возбудителя чумы проводили с помощью программ Mauve 2.3.1, Mega 5.0 и алгоритма BLAST на основе сравнения полногеномных последовательностей секвенированных штаммов *Y.pestis*. На найденные ДНК мишени рассчитывали праймеры и зонды в формате TaqMan, оптимизировали условия проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. *Результаты.* Найденны ДНК мишени, несущие мутации, маркерные для штаммов кавказского, алтайского, гиссарского, улегейского подвидов, штаммов из Таласского высокогорного очага чумы. Эффективность найденных ДНК мишеней и разработанного способа подвидовой дифференциации подтверждена на 101 штамме *Y.pestis* разных подвидов, выделенных в природных очагах России, ближнего и дальнего зарубежья. *Заключение.* Разработанный способ на основе метода ПЦР с регистрацией результатов в режиме реального времени обеспечивает проведение быстрой и эффективной дифференциации штаммов *Y.pestis* разных подвидов.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 22–27

Ключевые слова: возбудитель чумы, подвиды, эпидемическая значимость, дифференциация, ПЦР

*K.A.Nikiforov, E.G.Oglodin, L.M.Kukleva, G.A.Eroshenko,
V.G.Germanchuk, Z.L.Devdariani, V.V.Kutyrev*

SUBSPECIES DIFFERENTIATION OF *YERSINIA PESTIS* STRAINS BY PCR WITH HYBRIDIZATION-FLUORESCENT DETECTION

Russian Research Institute for Plague Control «Microb», Saratov, Russia

Aim. Develop a method of differentiation of *Y.pestis* strains of different subspecies based on PCR with hybridization-fluorescent detection in real-time. *Materials and methods.* DNA target search for differentiation of subspecies of plague causative agent was carried out by Mauve 2.3.1, Mega 5.0 and BLAST algorithm based on comparison of full-genome sequences of *Y.pestis* strains. Primers and TaqMan probes were calculated for the DNA targets found, conditions of PCR with hybridization-fluorescent detection — optimized. *Results.* DNA targets carrying marker mutations for the caucasus, altai, gissar, ulegei subspecies, strains from Talass alpine plague reservoir were detected. The effectiveness of the DNA targets found and the developed approach of subspecies differentiation is confirmed on 101 *Y.pestis* strains of different subspecies, isolated from natural foci of Russia, near and far abroad. *Conclusion.* The developed approach based on PCR with real-time detection allows for a rapid and effective differentiation of *Y.pestis* strains of various subspecies.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 22–27

Key words: plague causative agent, subspecies, epidemic significance, differentiation, PCR

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель чумы *Yersinia pestis* — этиологический агент особо опасной бактериальной инфекции, представляющей серьезную угрозу общественному здравоохранению. Согласно используемой в Российской Федерации и других странах СНГ классификации штаммы *Y.pestis* делится на пять подвидов — основной и четыре неосновных (кавказский, алтайский, гиссарский и улегейский) [2]. Помимо этих подвидов существуют обособленные группы штаммов с неустановленным систематическим положением, к которым относятся штаммы *Y.pestis* из Таласского высокогорного очага, имеющие ряд фенотипических и генетических особенностей [6].

Штаммы *Y.pestis* отличаются по вирулентности, эпидемической значимости и биохимической активности, циркулируют в разных ландшафтно-географических зонах. Штаммы основного подвида обладают высокой вирулентностью и эпидемической значимостью, а штаммы неосновных подвидов имеют избирательную вирулентность и низкую эпидемическую значимость. Установление принадлежности исследуемых штаммов *Y.pestis* к определенному подвиду делает возможным провести оценку их эпидемического потенциала, установить происхождение и вероятные пути заноса инфекции при проведении эпидемиологического расследования вспышек и случаев болезни.

При выполнении лабораторно-диагностических исследований подвидовую дифференциацию штаммов *Y.pestis* осуществляют на основе их различий в биохимической активности по отношению к сахарам и спиртам (ферментация сахаров и многоатомных спиртов, редукция нитратов) [3]. Однако надежность получаемых результатов находится в зависимости от условий культивирования штаммов и качества используемых сред, а для проведения анализа требуется выделение чистых культур возбудителя. Уровень развития современной микробиологии позволяет значительно ускорить эту длительную процедуру определения подвидовой принадлежности штаммов возбудителя чумы на основе методов молекулярно-генетического анализа, в том числе, простого и эффективного метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), применение которого позволяет получать стабильные и воспроизводимые результаты. Ранее нами разработан способ подвидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы, основанный на использовании метода ПЦР с электрофоретическим учетом результатов [4].

Целью исследования была разработка способа дифференциации штаммов *Y.pestis* разных подвидов на основе метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ). ПЦР-РВ требует меньше времени для проведения анализа по сравнению с ПЦР с электрофоретическим учетом результатов, а также снижает вероятность контаминации реакции ввиду отсутствия этапа электрофореза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск ДНК мишеней для подвидовой дифференциации штаммов *Y.pestis* осуществляли с помощью программ Mauve 2.3.1 и Mega 5.0 путем сравнения полногеномных последовательностей штаммов разных подвидов и групп, а также алгоритма BLAST с использованием полногеномных последовательностей штаммов *Y.pestis* из базы данных NCBI GenBank и штаммов, секвени-

рованных в РосНИПЧИ «Микроб». Последовательности зондов на найденные ДНК мишени рассчитывали таким образом, чтобы они были комплементарны участкам специфических для подвидов делеций и, следовательно, у штаммов, содержащих эти делеции, сигнал флуоресценции отсутствовал (табл. 1). Расчет праймеров проводили с помощью программы Vector NTI 10.

Для поиска специфичных ДНК мишеней были использованы полногеномные последовательности штаммов *Y.pestis* из базы данных NCBI GenBank: CO92, Nepal516, Antiqua, Pestoides F, Pestoides A, Pestoides B, 91001, а также полногеномные последовательности штаммов *Y.pestis* из коллекции РосНИПЧИ «Микроб»: 231 (708) (основной подвид), С-741 (кавказский подвид), И-2998 (алтайский подвид), А-1249 (гиссарский подвид), И-2422 (улегейский подвид), А-1815 (таласский штамм).

Анализ эффективности разработанного способа подвидовой дифференциации проводили на 101 штамме *Y. pestis* разных подвидов, выделенном в природных очагах России, в ближнем и дальнем зарубежье. Часть из использованных штаммов *Y.pestis* представлена в подписи к рисунку. Последовательности сконструированных праймеров и зондов в формате TaqMan приведены в табл. 1. В качестве флуоресцентных красителей использовали Cy5 (красный канал детекции флуоресценции), R6G (желтый канал), ROX (оранжевый канал), FAM (зеленый канал), а гасителей флуоресценции — RTQ1 и BHQ2. Условия проведения ПЦР-РВ были следующими: для мишени «45» — 1 цикл 95°C 10 мин; 40 циклов: 95°C 15 с, 57°C 40 с, 72°C 15 с; для мишени «89» — 1 цикл 95°C 15 мин; 10 циклов: 95°C 20 с, 56°C 20 с, 72°C 20 с; 30 циклов: 95°C 15 с, 57°C 45 с, 72°C 20 с; для мишени «Caucasic(-91)» — 1 цикл 95°C, 15 мин; 40 циклов: 95°C 15 с, 58°C 40 с; для мишени «Uleg(-88)» — 1 цикл 95°C 15 мин; 10 циклов: 95°C 20 с, 55°C 20 с, 72°C 20 с; 35 циклов: 95°C 20 с, 56°C 45 с, 72°C 20 с; для мишени «Alt(-90)» — 1 цикл 95°C 15 мин; 40 циклов: 95°C 15 с, 58°C 40 с; для мишени «His(-205)» — 1 цикл 95°C 15 мин; 40 циклов: 95°C 15 с,

Таблица 1. Последовательности сконструированных праймеров и зондов для проведения подвидовой дифференциации штаммов *Y.pestis*

Праймеры (S, As) и зонды (Zond)	Последовательности праймеров 5'-3'
45-S	GTGGATGAGAAAGTTTACCC
45-As	ATCACACCTGGATGGTTAC
45-Zond	FAM-ACTCAGCAAGCATCTGCTCAACATG-RTQ1
89-S	ATGAAATGACCCGACAACAG
89-As	GCTTACACTGGTGGTATTAG
89-Zond	FAM-TTGTTTAGGCGGCAGTTTATCTGCC-RTQ1
Caucasic(-91)-S	CAAAGGGGTGCAAAGTGAC
Caucasic(-91)-As	GCAAGTTGTTTCAGGCCG
Caucasic(-91)-Zond	R6G-GCGGGTCAAGAAAGCTATCGCTGCG-RTQ1
His(-205)-S	CTGACGATCGTTTCACTTC
His(-205)-As	GCTTCAATTTGCTGTTTGGT
His(-205)-Zond	ROX-TCGGACCAATTGATCAATGTCG-BHQ2
Alt(-90)-S	AATGCCAGTGAGATAACCC
Alt(-90)-As	ACCTTCCTGGCCGATGTA
Alt(-90)-Zond	R6G-GATGGCTTGACAGCAATTTCTGGC-RTQ1
Uleg(-88)-S	ATCAATTGTAGTGGAGGGG
Uleg(-88)-As	GCATCCATAGGTGCAGTA
Uleg(-88)-Zond	Cy5-TGAAGTTAGTGGGAGGATTGAGTTT-BHQ2
Tal(-72)-S	CGCAAGAGTTAGGGCTGGA
Tal(-72)-As	CCTAACAAGATCCCACGGC
Tal(72)-Zond	ROX-GGTGTATAGCGCCATCAATTTGGC-BHQ2

57°C 35 с и 72°C 15 с; для мишени «Tal(-72)» — 1 цикл 95°C 15 мин; 40 циклов 95°C 15 с, 59°C 35 с и 72°C 15 с. Амплификацию ДНК осуществляли для каждой ДНК мишени в отдельной реакции с использованием амплификатора Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). На этапе отжига праймеров проводили учет флуоресценции, уровень порога равнялся 0,05, специфичность реакции определялась значением Ct менее 31. Результат обеспечивался программным измерением зна-

Таблица 2. Анализ эффективности найденных ДНК мишеней и сконструированных на них праймеров и зондов для проведения подвидовой дифференциации штаммов *Y.pestis*

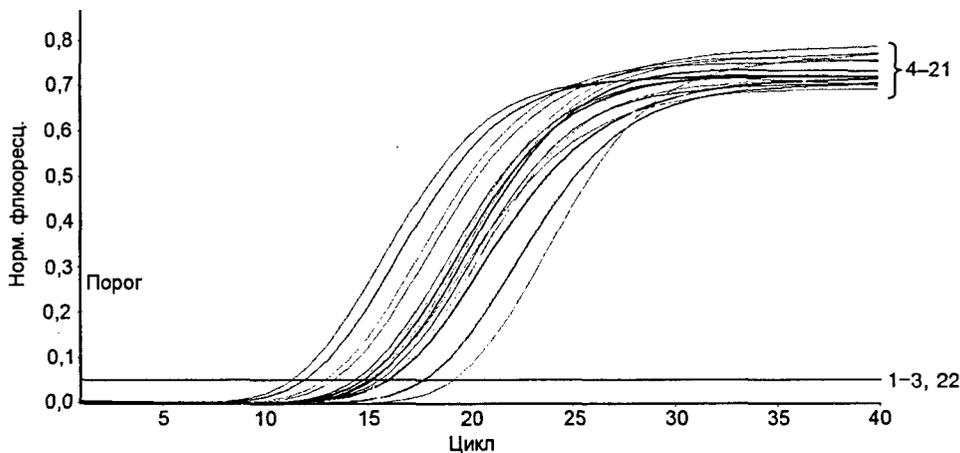
Штаммы, подвид (п/в)	Наличие сигнала флуоресценции по ДНК мишеням:						
	«45»	«89»	«Caucasic(-91)»	«Uleg(-88)»	«Alt(-90)»	«His(-205)»	«Tal(-72)»
Основной п/в — 42 штамма	—	—	+	+	+	+	+
Кавказский п/в — 15 штаммов	+	+	—	+	+	+	+
Алтайский п/в — 20 штаммов	+	+	+	+	—	+	+
Улегейский п/в — 7 штаммов	+	+	+	—	+	+	+
Гиссарский п/в — 10 штаммов	+	+	+	+	+	—	+
Таласские штаммы — 7 штаммов	+	+	+	+	+	+	—

чения St графика кривой флуоресценции, что отображалось в виде статуса реакции («реакция» и «нет реакции»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки быстрого и надежного способа определения подвидовой принадлежности исследуемых штаммов методом ПЦР-РВ нами проведен поиск ДНК мишеней, позволяющих проводить дифференциацию основного, кавказского, улегейского, алтайского, гиссарского подвидов, а также штаммов из Таласского высокогорного очага (табл. 2).

Для детекции штаммов высоковирулентного и эпидемически значимого основного подвида нами использованы переменные участки хромосомных локусов *ilvN* и *terC*, в которых у штаммов основного подвида ранее были обнаружены делеции размером в 45 и 89 п.н., отсутствующие у штаммов всех неосновных подвидов [1, 5]. На эти ДНК мишени (обозначенные как «45» и



Дифференциация штаммов *Y.pestis* основного и неосновных подвидов методом ПЦР-РВ с праймерами на мишень «45».

Штаммы *Y.pestis*: 1. 1116Д основной подвид, 2. Hamburg 15 основной подвид, 3. 231 (708) основной, 4. 6499 кавказский подвид, 5. 7896 кавказский подвид, 6. И-2422 улегейский подвид, 7. И-3071 улегейский подвид, 8. И-3130 улегейский подвид, 9. И-3131 улегейский подвид, 10. И-2998 алтайский подвид, 11. И-2359 алтайский подвид, 12. 2817 алтайский подвид, 13. 4857 алтайский п/одвид, 14. А-1728 гиссарский подвид, 15. А-1249 гиссарский подвид, 16. А-1633 гиссарский подвид, 17. А-1723 гиссарский подвид, 18. А-1816 таласская группа, 19. А-1805 таласская группа, 20. И-3085 группа *microtus*, 21. И-3086 группа *microtus*, 22. отрицательный контроль.

«89») нами рассчитаны праймеры и зонды для их использования в ПЦР-РВ (табл. 1). На рис. приведен пример разделения штаммов *Y.pestis* основного и неосновных подвидов методом ПЦР-РВ с использованием ДНК мишени «45».

В ПЦР-РВ с зондом в формате TaqMan, комплементарным области делеции и меченным красителем FAM, у штаммов основного подвида отсутствовали сигналы флуоресценции, которые проявлялись у штаммов других подвидов и групп. Эффективность рассчитанных праймеров и зондов на данные мишени проверена на 101 штамме, в том числе 42 штаммах основного подвида.

При сравнении полногеномной последовательности штамма *Y.pestis* C-741 кавказского подвида с последовательностями штаммов других подвидов нами выявлена мутация, специфическая для штаммов кавказского подвида — делеция размером 91 п.н. в гене AK38_2123 (обозначение гена по геному референтного штамма *Y.pestis* CO92, NCBI GenBank). На выявленную ДНК мишень, обозначенную как «Caucasic(-91)», рассчитаны праймеры и зонд и определены условия проведения реакции («Материалы и методы», табл. 1). В ПЦР-РВ с зондом, меченным красителем R6G, у всех использованных 15 штаммов кавказского подвида отсутствовал флуоресцентный сигнал, который проявлялся у штаммов других подвидов.

При анализе генома штамма *Y.pestis* И-2422 улегейского подвида обнаружена мутация, маркерная для штаммов этого подвида — делеция в 88 п.н. в гене AK38_1098. Эта ДНК мишень обозначена как «Uleg(-88)». В ПЦР-РВ с зондом на эту мишень, меченным красителем Cy5 (табл. 1), у всех исследованных штаммов улегейского подвида отсутствовал флуоресцентный сигнал, который регистрировался у других штаммов.

Мутация, маркерная для штаммов алтайского подвида — делеция в 90 п.н. в гене AK38_1327, выявлена нами при сравнении последовательности штамма алтайского подвида *Y.pestis* И-2998 с последовательностями штаммов других подвидов. В ПЦР с рассчитанными нами праймерами и зондом, меченным красителем R6G, на мишень Alt(-90) у всех 20 исследованных штаммов алтайского подвида отсутствовал сигнал флуоресценции, в отличие от штаммов других подвидов и групп.

При анализе нуклеотидной последовательности генома штамма *Y.pestis* А-1249 гиссарского подвида выявлена маркерная для штаммов гиссарского подвида делеция размером 205 п.н. в гене AK38_334. В связи с большим размером делеции, праймеры на эту ДНК мишень рассчитаны таким образом, чтобы они попадали в область делеции, тогда как праймеры на другие мишени были комплементарны участкам, фланкирующим делецию (табл. 1). В ПЦР-РВ с зондом на мишень His(-205), меченным красителем ROX, у всех исследованных нами 10 штаммов гиссарского подвида отсутствовал флуоресцентный сигнал, который проявлялся у штаммов других подвидов и групп.

В геноме штамма *Y.pestis* А-1815 удалось найти мутацию, специфическую для штаммов из Таласского высокогорного очага чумы в Киргизии, которая представляла собой делецию размером 72 п.н. в гене AK38_181. В ПЦР-РВ с праймерами и зондом на мишень Tal(-72), меченным красителем ROX, у штаммов таласской группы отсутствовал флуоресцентный сигнал, который проявлялся у штаммов других подвидов.

Таким образом, нами разработан способ подвидовой дифференциации штаммов *Y.pestis* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом

результатов в режиме реального времени. Ранее метод ПЦР-РВ не использовался для определения подвидовой принадлежности штаммов *Y.pestis*. При сравнении нуклеотидных последовательностей штаммов *Y.pestis* основного и неосновных подвидов нами выявлены мутации, специфичные для штаммов кавказского, алтайского, гиссарского, улегейского подвидов, штаммов из Таласского высокогорного очага чумы, использование которых в комплексе с двумя ранее найденными маркерными для штаммов основного подвида ДНК мишенями позволяет проводить быструю дифференциацию штаммов разных подвидов на основе метода ПЦР-РВ. Эффективность и специфичность сконструированных праймеров и зондов подтверждена на наборе из 101 штамма *Y.pestis* разных подвидов из природных очагов Российской Федерации, стран ближнего и дальнего зарубежья. Разработка такого способа подвидовой дифференциации имеет важное значение для практики, поскольку может обеспечить разделение штаммов *Y.pestis* разных подвидов, отличающихся по вирулентности и эпидемической значимости, а также позволит устанавливать принадлежность исследуемого штамма к конкретному подвиду. Последнее особенно важно при проведении эпидемиологического мониторинга в тех природных очагах чумы Российской Федерации и сопредельных государств, в которых одновременно циркулируют штаммы основного и неосновных подвидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Павлова А.И., Краснов Я.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis*. Журн. микробиол. 2012, 3:25-35.
2. Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Yersinia pestis*. Проблемы особо опасных инфекций. 1998, 1:11 — 12.
3. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. М., Шико, 2013.
4. Одинокоев Г.Н., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Краснов Я.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ подвидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы методом полимеразной цепной реакции. Патент РФ № 2552611. Бюл. № 16, 2015.
5. Одинокоев Г.Н., Павлова А.И., Анисимова Л.В., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов и возбудителя псевдотуберкулеза методом полимеразной цепной реакции. Патент РФ № 2425891. Бюл. №16, 2011.
6. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В.Кутырева. М., Медицина, 2004.

Поступила 26.09.16

Контактная информация: Ерошенко Галина Александровна,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452)26-21-31