

Е.Г.Оглодин, Г.Н.Одинок, К.А.Никифоров, Л.М.Куклева, Г.А.Ерошенко

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОВАРИАНТОВ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ОСНОВНОГО ПОДВИДА МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Впервые разработан способ определения геновариантов штаммов *Yersinia pestis* основного подвида методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. Для дифференциации геновариантов античного (0.ANT, 1.ANT, 2.ANT, 4.ANT), средневекового (2.MED, 2.MED0) и восточного (1.ORI) биоваров использован комплекс ДНК-мишеней, большинство из которых выявлено впервые. Применение их в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов обеспечивает быстрое и надежное разделение штаммов этих геновариантов, циркулирующих в различных географических регионах. Эффективность метода подтверждена при анализе 110 штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории России, ближнего и дальнего зарубежья, в том числе 37 штаммов античного, 53 штаммов средневекового и 20 штаммов восточного биоваров.

Ключевые слова: возбудитель чумы, основной подвида, геноварианты, ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов.

E.G.Oglodin, G.N.Odinokov, K.A.Nikiforov, L.M.Kukleva, G.A.Eroshenko

Identification of Genovariants of *Yersinia pestis* Strains Belonging to Main Subspecies Using PCR with Hybridization-Fluorescent Registration of Results

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

For the first time ever developed has been the method of identification of genovariants in *Yersinia pestis* strains belonging to the main subspecies using PCR with hybridization-fluorescent registration of results. A complex of DNA-targets, the most of which are newly detected ones, have been utilized to differentiate between genovariants of antique (0. ANT, 1.ANT, 2.ANT, 4.ANT), medievalis (2.MED, 2.MED0), and orientalis (1.ORI) biovars. Application of these targets in PCR with hybridization-fluorescent registration of results provides for a rapid, effective and reliable classifying of the strains of the genovariants, circulating in various geographical regions. Efficacy of the method has been validated via analysis of 110 *Y. pestis* strains, isolated in the territory of the Russian Federation, neighboring countries and beyond, including 37 strains of antique, 53 strains of medievalis, and 20 strains of orientalis biovars.

Key words: plague agent, the main subspecies, genovariants, PCR with hybridization-fluorescent registration of results.

В основной подвида возбудителя чумы входят штаммы *Yersinia pestis* с высокой и универсальной вирулентностью и высокой эпидемической значимостью. На основании биохимических отличий и по историко-географическому принципу штаммы основного подвида делятся на античный, средневековый и восточный биовары, каждый из которых вызвал одну из трех прошедших в истории пандемий чумы. По результатам проведенного полногеномного секвенирования ряда штаммов *Y. pestis* выделены три филогенетические линии основного подвида: древняя линия «0» и две ее производные «1» и «2». В эти филогенетические линии входят основные геноварианты античного (0.ANT, 1.ANT, 2.ANT), средневекового (2.MED) и восточного (1.ORI) биоваров [6, 8]. Выполненное недавно полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного и Тувинского горного очагов, расположенных в России, позволило выделить еще два геноварианта штаммов средневекового (2.MED0) и античного (4.ANT) биоваров [3]. Штаммы геноварианта 4.ANT античного биовара были выявлены ранее и на территории Монголии [7].

Определение геноварианта штамма (и, следовательно, его географического происхождения) важно

для установления источника происхождения и вероятных путей заноса инфекции, что требует разработки быстрых и надежных способов молекулярной идентификации геновариантов возбудителя чумы. Целью этого исследования была разработка способа определения геновариантов штаммов *Y. pestis* основного подвида методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов.

Материалы и методы

В работе использовано 110 штаммов *Y. pestis* основного подвида, выделенных в природных очагах России, в ближнем и дальнем зарубежье (табл. 1). Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* выполняли стандартным методом в соответствии с МУ 1.3.2569-09 [4].

Последовательности использованных праймеров и зондов в формате TaqMan приведены в табл. 2. В качестве флуоресцентных красителей использовали FAM и ROX красители, а гасителей флуоресценции – BHQ1 и BHQ2. Условия проведения реакции были следующими: для мишеней «gIpd» и «TUV» – 1 цикл при 95 °C в течение 15 мин, затем 35 циклов при 95 °C 15 с, 60 °C 20 с, 72 °C 10 с; «med24» и

Таблица 1

Использованные в работе штаммы *Y. pestis* основного подвида и определение их геновариантов

Штаммы, происхождение, шт.	ДНК мишени, наличие сигнала в ПЦР						Геновариант
	cusφ	70	med24	pCKF	glpD	TUV+	
Античный биовар							
Высокогорные очаги Тянь-Шаня – 15 штаммов	–	+	+	–	+	–	0.ANT
Африка – 4	+	+	+	–	+	–	1.ANT
Забайкальский степной очаг – 8	–	–	+	–	+	–	2.ANT
Тувинский горный очаг, Монголия – 10	–	+	+	–	+	+	4.ANT
Средневековый биовар							
Очаги Прикаспия, Кавказа, Средней Азии – 35	–	–	–	–	+	–	2.MED
Центрально-Кавказский высокогорный очаг – 18	–	+	+	+	+	–	2.MED0
Восточный биовар							
Вьетнам, США, Европа – 20	+	+	+	–	–	–	1.ORI

«pCKF» – 1 цикл при 95 °С в течение 15 мин, затем 35 циклов при 95 °С 20 с, 56 °С 40 с; «Cusφ» – 1 цикл при 95 °С в течение 15 мин, затем 35 циклов при 95 °С 15 с, 60 °С 30 с, 72 °С 25 с; «70» – 1 цикл при 95 °С в течение 15 мин, затем 35 циклов при 95 °С 15 с, 60 °С 20 с, 72 °С 10 с. Амплификацию ДНК осуществляли для каждой ДНК-мишени в отдельной реакции в амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). На этапе отжига праймеров проводили учет флуоресценции, уровень порога равнялся 0,05, специфичность реакции определялась значением St менее 31. Результат обеспечивался программным измерением значения St графика кривой флуоресценции, что отображалось в виде статуса реакции («реакция» и «нет реакции»).

Результаты и обсуждение

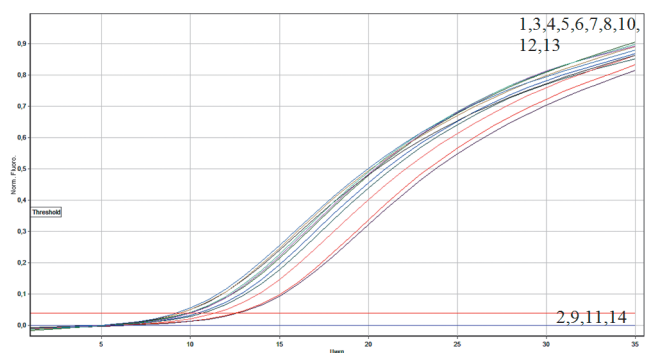
Для разработки быстрого и надежного способа определения геновариантов основного подвида возбудителя чумы в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов проведен поиск эффективных ДНК мишеней, обеспечивающих выявление геновариантов античного (0.ANT, 1.ANT, 2.ANT, 4.ANT), средневекового (2.MED, 2.MED0) и восточного (1.ORI) биоваров. Ранее нами было установлено, что в геноме штаммов средневекового биовара между генами *gcuT* и *visC* после 3626562 нуклеотида присутствует делеция размером 24 п.н., которая отсутствует у штаммов других биоваров [1]. Для выявления штаммов средневекового биовара (геновариант 2.MED) в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на мишень «Med24» рассчитаны праймеры, фланкирующие делецию, и зонд в варианте TaqMan, комплементарный самому участку делеции (табл. 2). Эффективность рассчитанных праймеров и зонда проверена на 110 использованных в этой работе штаммах основного подвида, в том числе на 35 штаммах средневекового биовара (табл. 1). У всех штаммов античного и восточного биоваров наблюдался положительный сигнал амплификации, который отсутствовал у штаммов средневекового биоваров (рисунок, А). Единственным

исключением оказались штаммы средневекового биовара из некоторых участков Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы. Эти штаммы отнесены нами ранее к геноварианту 2.MED0 на основе полногеномного секвенирования одного из них – *Y. pestis* C-627 [3]. Штаммы геноварианта 2.MED0 содержат уникальную криптическую плазмиду размером 5,4 т.п.н., которая отсутствует у других штаммов *Y. pestis* [2, 5]. На основе впервые полученной полной нуклеотидной последовательности этой плазмиды выбран ее участок в позиции 3205–3332, который обозначен нами как мишень «pCKF», рассчитаны праймеры и зонд в формате TaqMan для специфической детекции штаммов средневекового биовара геноварианта 2.MED0 (табл. 2). Их эффективность проверена на использованных в этой работе штаммах основного подвида, включая 18 штаммов из Центрально-Кавказского вы-

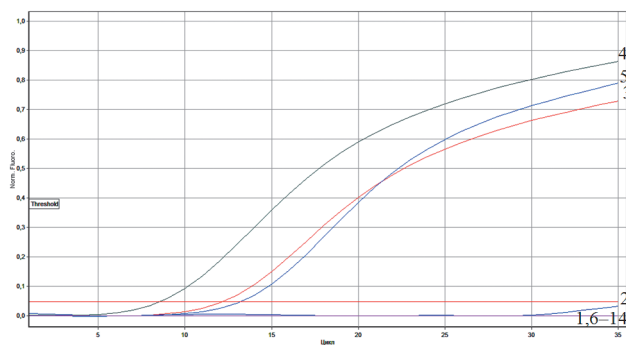
Таблица 2

Использованные в работе праймеры и зонды

ДНК-мишень	Последовательность 5'-3'
cusφ-S	AGCGTACTCACGCTAATG
cusφ-As	TATGGCGGACAAACAGAG
cusφ-P	FAM-CACTCGACTTATGAAGAACTGGCC-BHQ1
med24-S	GCCAGTGTGTGTCTAAA
med24-As	CAACATTCGTCGCAAAG
med24-P	FAM-ACATTGTGCTGGACTCACAGCCCC-BHQ1
pCKF-S	AACCGCCTAAGCACTTTAT
pCKF-As	CGTCAGGAACCAACGAA
pCKF-P	FAM-ATCAGAGAGCAATTTGAGCGGTTG-BHQ1
glpD-S	CAAGGCTTCACTTACCAAG
glpD-As	CAGAGGAAGGTAACATGGA
glpD-P	FAM-TACCGACAGGCCACGCCAG-BHQ1
TUV-S	CGCCGCCATTCCGATTTA
TUV-As	TCTGGCTTCCCGTTCTCTGC
TUV-P	FAM-TGTGCTTATCAGGACAACCAGCACA-BHQ1
70-S	AGCGTCGTTTCTGCATCG
70-As	CGCCGATTCAGTGCAGAT
70-P	ROX-CTGAGGGTTTCGCATAGCC-BHQ2



А



Б

Выявление типичных и атипичных штаммов средневекового биовара методом ПЦР с гибридно-флуоресцентным учетом результатов на мишени «Med24» (А) и «rCKF» (Б):

Штаммы *Y. pestis*: 1 – Sonche восточный биовар (б/в) (положительный контроль); 2 – 107 средневековый б/в (нет реакции); 3 – С-730 средневековый б/в, атипичный; 4 – КМ 919 средневековый б/в, атипичный; 5 – КМ 921 средневековый б/в, атипичный; 6 – 210 (301) античный б/в; 7 – Hamburg 15 восточный б/в; 8 – 231(708) античный б/в (положительный контроль); 9 – 99 средневековый б/в (нет реакции); 10 – И-3036 античный б/в; 11 – Kurdistan 290 средневековый б/в (нет реакции); 12 – А-1836 античный б/в; 13 – И-1996 античный б/в; 14 – отрицательный контроль

сокогорного очага. Положительный сигнал гибридизации наблюдался в ПЦР только у штаммов геноварианта 2.MED0 и отсутствовал у штаммов геноварианта 2.MED и других биоваров основного подвида, что свидетельствует о специфичности выбранной мишени для детекции штаммов геноварианта 2.MED0 (рисунков, Б). Использование в ПЦР праймеров и зондов на две ДНК-мишени – «Med24» и «rCKF» обеспечивает выявление всех штаммов средневекового биовара и их дифференциацию от штаммов других биоваров основного подвида.

Для выявления геноварианта 1.ORI восточного биовара нами рассчитаны праймеры и зонд на известную генетическую метку штаммов этого биовара – делецию в 93 п.н. в гене глицерол-3-фосфатдегидрогеназы в позиции 19–111 от начала гена [9]. Праймеры комплементарны последовательностям, фланкирующим делецию, а зонд комплементарен участку самой делеции (табл. 2). В ПЦР у всех 20 использованных штаммов восточного биовара положительный сигнал гибридизации отсутствовал в отличие от штаммов других биоваров и подвидов.

Штаммы *Y. pestis* основного подвида, которые не содержат делеций в мишенях «Med24» и «glpD»

и у которых отсутствует мишень «rCKF», относятся к античному биовару. Для разделения геновариантов штаммов античного биовара нами проведен поиск эффективных ДНК-мишеней на основе сравнительного анализа полногеномных последовательностей штаммов этого биовара, представленных в базе данных NCBI GenBank с помощью алгоритма BLAST. Эффективным для выявления геноварианта 1.ANT оказался участок генома, содержащий у штаммов этого геноварианта филаментозный фаг CUSφ. Рассчитанные нами праймеры и зонд в формате TaqMan комплементарны последовательности этого фага (табл. 2), поэтому у штаммов геноварианта 1.ANT в ПЦР наблюдался положительный флуоресцентно-гибридизационный сигнал. Филаментозный фаг CUSφ также содержится и в геноме всех штаммов восточного биовара 1.ORI, однако геновариант античного биовара 1.ANT отделяется от геноварианта 1.ORI по наличию сигнала в ПЦР по ДНК-мишени «glpD». У штаммов восточного биовара сигнал по мишени «glpD» отсутствует (табл. 1).

Для дифференциации штаммов другого геноварианта античного биовара – 2.ANT выбрана выявленная нами мишень «70», которая представляет участок гена у1694, содержащий у штаммов этого геноварианта делецию размером 70 п.н. после 811 н. от начала гена. Рассчитаны праймеры на участки гена у1694, фланкирующие делецию, и зонд, комплементарный самому участку делеции (табл. 2). В ПЦР у штаммов геноварианта 2.ANT положительный сигнал гибридизации отсутствует. Делеция размером в 70 п.н. в гене у1694 присутствует также и у штаммов средневекового биовара геноварианта 2.MED, однако геновариант 2.ANT отделяется от них по наличию положительного сигнала по мишени «Med24». У штаммов геноварианта 2.MED этот сигнал отсутствует (табл. 1).

Для выявления штаммов античного биовара геноварианта 4.ANT, циркулирующих в Тувинском горном очаге и Монголии, использован участок криптоической плазмиды размером 34 т.п.н., присутствующий в этих штаммах. В качестве ДНК мишени, обозначенной «TUV», выбран участок плазмиды, расположенный в гене *parA*. Праймеры и зонд рассчитаны на последовательность плазмиды, поэтому в ПЦР положительный гибридно-флуоресцентный сигнал наблюдался у 10 штаммов геноварианта 4.ANT и отсутствовал у других биоваров и подвидов.

Штаммы античного биовара, которые не дифференцируются с помощью мишеней «cusφ», «70» и «TUV», относятся к геноварианту 0.ANT античного биовара.

Эффективность разработанного нами метода определения геновариантов основного подвида античного, средневекового и восточного подтверждена на 110 штаммах основного подвида античного, средневекового и восточного биоваров (табл. 1).

Таким образом, нами впервые разработан эф-

фективный способ определения геновариантов основного подвида возбудителя чумы в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, использование которого позволяет ускорить процедуру определения внутривидовой принадлежности и региона происхождения штаммов *Y. pestis*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошенко Г.А., Одинок Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Генетические основы вариабельности признака редукции нитратов у штаммов *Yersinia pestis*. *Генетика*. 2014; 50:1–9.
2. Жаринова Н.В., Брюханова Г.Д., Еременко Е.И., Брюханов А.Ф., Бейер А.П., Царева Н.С., Зайцев А.А. Свойства штаммов чумного микроба, циркулирующих в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы. *Акт. пробл. эпидемиол. и профилактик. инф. бол.* 2004; 2:14.
3. Одинок Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Анализ полногеномной последовательности штаммов *Yersinia pestis* на основе ступенчатого 680-SNP алгоритма. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 3:49–54.
4. Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569-09.
5. Проценко С.Л., Сердюкова Т.В., Розанова Г.Н. Выявление новой плазмиды у пролинзависимых штаммов возбудителя чумы из Центрально-Кавказского природного очага и гетерогенность циркулирующих в нем штаммов по плазмидному составу. В кн.: *Особо опасные инфекции на Кавказе*. Ставрополь; 1987. С. 265–7.
6. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(24):14043.
7. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(2):577.
8. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Raumagnac P., Wagner D.V., Feldcamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R. Phylogenetic diversity and historical patterns of pandemic spread of *Yersinia pestis*. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140.
9. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M., Hu P., Worsham P.L., Ott L.L., Slezak T.R., Sokhansanj B.A., Regala W.M., Brubaker R.R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of struc-

tural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *J. Bacteriol.* 2002; 184(4):1019–27.

References

1. Eroshenko G.A., Odiнок G.N., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Kutyrёv V.V. [Genetic foundations of the variability of nitrate reduction in *Yersinia pestis* strains]. *Genetika*. 2014; 50:1–9.
2. Zharinova N.V., Bryukhanova G.D., Eremenko E.I., Bryukhanov A.F., Beyer A.P., Tsareva N.S., Zaitsev A.A. [Properties of the plague agent strains circulating in Central-Caucasian high-mountain natural focus of plague]. *Aktual. Probl. Epidemiol. Profilakt. Infek. Bol.* 2004; 2:14.
3. Odiнок G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Shavina N.Yu., Kutyrёv V.V. [Analysis of the genome wide sequence of *Yersinia pestis* strains based on the consecutive 680-SNP algorithm]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 3:49–54.
4. [Management of the laboratories using methods of nucleic acids amplification when working with the materials containing microorganisms of the I–IV groups of pathogenicity. Methodological Regulations]. MR 1.3.2569-09.
5. Protsenko S.L., Serdyukova T.V., Rozanov G.N. [Detection of new plasmid in proline-dependent plague agent strains found in Central-Caucasian natural focus and heterogeneity in plasmid composition of the circulating in the focus strains]. In: [Particularly dangerous infections in the Caucasus]. Stavropol, 1987; 265–7.
6. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(24):14043.
7. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(2):577.
8. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Raumagnac P., Wagner D.V., Feldcamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R. Phylogenetic diversity and historical patterns of pandemic spread of *Yersinia pestis*. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140.
9. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M., Hu P., Worsham P.L., Ott L.L., Slezak T.R., Sokhansanj B.A., Regala W.M., Brubaker R.R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *J. Bacteriol.* 2002; 184(4):1019–27.

Authors:

Oglodin E.G., Odiнок G.N., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Eroshenko G.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Оглодин Е.Г., Одинок Г.Н., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 09.07.14.