

К.А.Никифоров, Г.Н.Одинок, Л.А.Новичкова, Г.А.Ерошенко

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* АЛТАЙСКО-ГИССАРСКОЙ ГРУППЫ НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ МЕТОДОМ ПЦР

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

На основе сравнения полногеномных последовательностей штаммов алтайского и гиссарского неосновных подвидов возбудителя чумы, штаммов из Таласского высокогорного очага чумы выявлены две новые ДНК-мишени, использование которых обеспечивает простое и быстрое разделение в ПЦР этих близкородственных штаммов неосновных подвидов, представляющих отдельную филогенетическую линию эволюции возбудителя чумы. Одна из мишеней расположена в межгенном участке между генами YPO3333 и YPO3332 и содержит у штаммов алтайского подвида делецию размером 122 п.н., а вторая является участком гена YPO2412 и включает у таласских штаммов делецию в 72 п.н. На эти ДНК мишени рассчитаны праймеры, и определены условия проведения реакции. Эффективность способа разделения штаммов алтайско-гиссарской группы неосновных подвидов подтверждена при изучении 97 штаммов *Y. pestis* разных подвидов.

Ключевые слова: возбудитель чумы, неосновные подвиды, дифференциация, ПЦР, ДНК-мишени.

K.A.Nikiforov, G.N.Odinokov, L.A.Novichkova, G.A.Eroshenko

Differentiation between *Yersinia pestis* Strains of Altaic-Hissar Group of Non-Main Subspecies by Means of PCR

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

On the basis of comparison between the genome-wide sequences of Altaic and Hissar strains of non-main subspecies and strains from Talas high-mountain plague focus, identified have been two novel DNA-targets, the usage of which provides for easy rapid subdivision of these closely-related strains of non-main subspecies that fall into separate phylogenetic branches of plague agent evolution, applying PCR assay. One of the targets is allocated to intergenic region between YPO3333 and YPO3332 genes. In strains of *altaica* ssp. it contains 122 bps deletion. The other target is YPO2412 gene region which contains 72 bps deletion in Talas strains. Special primers for DNA-targets have been designed. Established have also been test specifications. Efficacy of the method for differentiation between the strains of Altaic-Hissar group of non-main subspecies is validated on 97 *Y. pestis* strains of various ssp.

Key words: plague agent, non-main subspecies, differentiation, PCR, DNA-targets.

Штаммы возбудителя чумы *Yersinia pestis*, кроме высоковирулентных и эпидемически значимых штаммов основного подвида, широко распространенных в природных очагах чумы в Российской Федерации и за рубежом, включают четыре неосновных подвида – кавказский, алтайский, гиссарский и улегейский. Штаммы неосновных подвидов, несмотря на избирательную вирулентность и низкий эпидемический потенциал, также способны вызывать заболевание у людей. Неосновные подвиды имеют ограниченное распространение и циркулируют на эндемичных территориях: штаммы кавказского подвида – в очагах Кавказа и Закавказья, алтайского подвида – в Алтайском горном очаге и в Монголии, гиссарского – в Гиссарском высокогорном очаге, улегейского – в очагах Монголии. Дифференциацию штаммов разных подвидов проводят на основе их различий в биохимической активности. Штаммы основного подвида в отличие от штаммов всех неосновных подвидов не ферментируют рамнозу и мелибиозу, улегейского – не редуцируют нитраты, алтайского и гиссарского – не редуцируют нитраты и не ферментируют арабинозу, а штаммы кавказского подвида биохимически активны по всем этим признакам. В настоящее время эта длительная процедура определения подвидовой

принадлежности *Y. pestis* может быть заменена методами молекулярной идентификации на основе выявления отличий в структуре геномов штаммов с различной подвидовой принадлежностью. Метод ПЦР позволяет быстро и просто проводить молекулярную идентификацию штаммов *Y. pestis*, оценивать их эпидемическую значимость. Ранее нами был разработан способ дифференциации штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов и близкородственного псевдотуберкулезного микроба методом ПЦР, который обеспечивает их эффективное разделение и который включен в стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов возбудителя чумы [2].

Важной задачей является разработка способа ПЦР-дифференциации штаммов неосновных подвидов, который позволит быстро определить подвиговую принадлежность штамма и регион его географического происхождения. Штаммы кавказского подвида представляют отдельную филогенетическую линию на общем стволе эволюции возбудителя чумы, имеют ряд уникальных мутаций, например в генах факторов роста, и их дифференциация в ПЦР не составляет трудности [3]. Отдельную ветвь эволюции неосновных подвидов представляют и штаммы улегейского подвида, которые также имеют ряд

маркерных делеций в геноме. Наиболее сложной и до сих пор нерешенной задачей является разработка простого и эффективного способа разделения в ПЦР штаммов алтайского и гиссарского подвидов, ввиду высокого сходства их генетической организации и отсутствия выявленных ДНК мишеней для проведения этого разделения. Нами показано, что штаммы алтайского и гиссарского подвидов составляют единую филогенетическую линию на общем стволе эволюции возбудителя чумы [6].

Штаммы алтайского подвида по опубликованной схеме мирового генетического разнообразия отнесены к геноварианту 0.РЕ4, к которому также относятся штаммы *microtus*, циркулирующие в двух очагах чумы в Китае [5]. Данные по определению геновариантной принадлежности штаммов гиссарского подвида в литературе отсутствуют. Неясно также систематическое положение штаммов неосновного подвида, выделяемых в Таласском высокогорном очаге в Киргизии. По фенотипическим дифференциальным биохимическим характеристикам – отсутствию способности к редукции нитратов и ферментации арабинозы, все штаммы этих неосновных подвидов относятся к близкородственной группе штаммов, которую мы обозначили как алтайско-гиссарская группа геноварианта 0.РЕ4. Проведенное недавно секвенирование геномов ряда штаммов алтайского, гиссарского подвидов и штаммов из Таласского высокогорного очага в рамках выполняемой в РосНИПЧИ «Микроб» программы по полногеномному секвенированию штаммов из природных очагов России и других стран СНГ позволило нам провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей этих штаммов для выявления отличий в их генетической организации.

Целью исследования был поиск эффективных ДНК-мишеней и разработка способа дифференциации штаммов *Y. pestis* алтайского, гиссарского подвидов и родственных им таласских штаммов и штаммов *microtus* методом ПЦР.

Материалы и методы

Использованные в работе штаммы приведены в табл. 1. Выделение ДНК штаммов проводили в соот-

ветствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» [4].

ПЦР осуществляли с применением амплификатора с прогреваемой крышкой БИС Н (Кольцово, Россия). Для мишени «Alt(-122)» использовали программу амплификации: 1 цикл 94 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов – 94 °С 45 с, 58 °С 1 мин, 72 °С 45 с и завершающий цикл 3 мин при 72 °С. Для мишени «Tal(-72)» использовали программу: 1 цикл 94 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов – 94 °С 45 с, 60 °С 1 мин, 72 °С 45 с и завершающий цикл 3 мин при 72 °С. Для мишени «aRaCF1/aRaCR1» амплификацию фрагмента осуществляли по следующей схеме: 1 цикл 94 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов при 94 °С 45 с, 56 °С 1 мин, 72 °С 45 с и завершающий цикл 3 мин при 72 °С.

Использованные в работе праймеры приведены в табл. 2. Учет результатов осуществляли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Определение размеров образуемых в ПЦР фрагментов проводили с помощью стандарта молекулярных масс (GenRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas. Литва) с размером от 100 до 1000 п.н.

Сравнение полногеномных последовательностей штаммов осуществляли с помощью программы MEGA5 и алгоритма BLAST. Расчет праймеров проводили в программе Vector NTI.

Результаты и обсуждение

Всего в работе использовано 97 штаммов *Y. pestis* различных подвидов (табл. 1).

Ранее нами при сравнительном анализе геномов штаммов возбудителя чумы был выявлен вариабельный хромосомный локус, расположенный в межгенном участке между геном *wzyE* (общий антиген энтеробактерий) и геном *dapF* (диаминопимелат-эпимераза). У штаммов кавказского и улегейского подвидов этот локус находится в интактном состоянии, в то время как у штаммов *Y. pestis* основного подвида в нем содержится делеция размером 34 п.н., а у штаммов алтайского и гиссарского подвидов и штаммов *microtus* – вставка размером 17 п.н. Таким обра-

Таблица 1

Использованные в работе штаммы *Y. pestis* и определение их подвидовой принадлежности методом ПЦР

Штаммы, происхождение, количество	ДНК-мишени, размер амплификата в п.н.			Подвид (п/в), группа (гр.)
	Alt(-122)	Tal(-72)	aRaC(-112)	
Алтайский горный очаг – 32 штамма	90	165	814	алтайский п/в
Монголия – 2 штамма И-3085 И-3086	212	165	702	гр. <i>microtus</i> не определено
Гиссарский высокогорный очаг – 8 штаммов	212	165	814	гиссарский п/в
Таласский высокогорный очаг – 10 штаммов	212	93	814	гр. таласская
Очаги Кавказа и Закавказья – 20 штаммов	212	165	814	кавказский п/в
Очаги Прикаспия и Средней Азии – 25 штаммов	212	165	814	основной п/в

Использованные в работе праймеры

ДНК мишень	Последовательность 5'–3'	Температура отжига	Ссылка
Alt(-122)	Alt(-122)-S CGCAGCTAACTGTTTATG Alt(-122)-As ATTCTAGTGGGTGAATG	58 °C	данная работа
Tal(-72)-	Tal (-72)-S CGCAAGAGTTAGGGCTGGA Tal (-72)-As CCTAACAAGATCCCACGGC	60 °C	«—»
aRaC(-112)	aRaCF1 CGGACGATATAAGGTTACG aRaCR1 TCC GGTAATAAATTGACAG	56 °C	Zhou <i>et al.</i> , 2004

зом, использование этого участка генома позволяет проводить отделение штаммов алтайско-гиссарской группы от других подвидов возбудителя чумы.

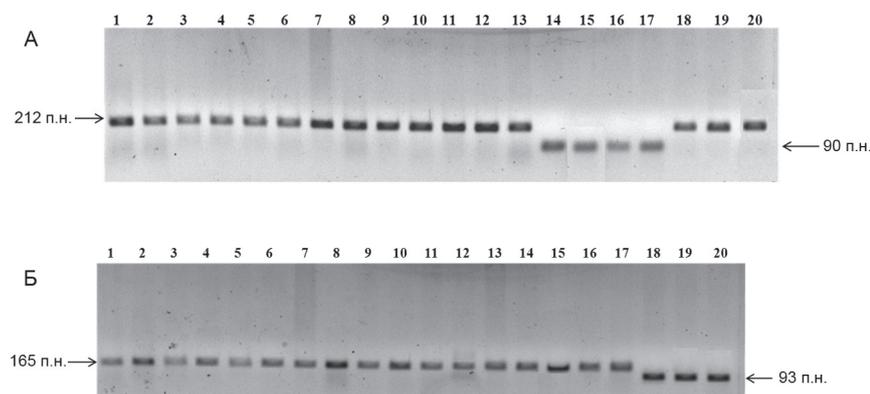
Для выявления в ПЦР штаммов алтайского подвида в этой работе нами проведен поиск эффективной ДНК-мишени на основе сравнения полученных в РосНИПЧИ «Микроб» полных нуклеотидных последовательностей штаммов неосновных подвидов с помощью программы MEGA и алгоритма BLAST. В результате удалось выявить новую перспективную ДНК-мишень, расположенную в межгенном участке между геном YPO3333 (кодирует L-ксилозо-5-фосфат-3-эпимеразу) и геном YPO3332 (кодирует предполагаемый ABC транспортный белок сахаров, белок пермеазы) и содержащую делецию размером 122 п.н. у штаммов алтайского подвида, которая отсутствует у штаммов гиссарского подвида, а также у других подвидов *Y. pestis*. Этот локус обозначен нами как «Alt(-122)» и использован для дифференциации штаммов алтайского подвида. На него рассчитаны праймеры, и определены оптимальные условия проведения реакции (табл. 2). Их эффективность проверена на 97 использованных в этой работе штаммах *Y. pestis* разных подвидов. Показано, что делеция размером 122 п.н. присутствовала только в геноме 32 исследованных штаммов из Алтайского горного очага и отсутствовала у штаммов других подвидов (рис. А). Исключение составили два имевшихся в нашей коллекции штамма алтайского подвида из Монголии – *Y. pestis* И-3085 и И-3086, у которых эта генетическая метка отсутствовала.

Для дифференциации штаммов *microtus* от других штаммов алтайско-гиссарской группы мы использовали праймеры на описанную ранее характерную генетическую метку штаммов *microtus* – делецию в 112 п.н. в регуляторном гене арабинозного оперона

araC (табл. 2) [1, 7]. Применение этих праймеров при изучении использованных штаммов показало ее отсутствие у всех штаммов алтайского и гиссарского подвидов, таласских штаммов, а также у штаммов основного и улегейского подвидов. Единственным штаммом, у которого эта делеция присутствовала оказался штамм *Y. pestis* И-3085 из Монголии, который по паспортным данным отнесен к алтайскому подвиду. Однако отсутствие у него выявленной нами генетической метки штаммов алтайского подвида из Алтайского горного очага чумы, наряду с наличием характерной мутации штаммов *microtus*, свидетельствует о том, что он относится к последним.

Для выявления ДНК мишени для дифференциации штаммов из Таласского высокогорного очага в Киргизии и их отделения от других штаммов алтайско-гиссарской группы нами проведен сравнительный анализ полногеномной последовательности секвенированного в РосНИПЧИ «Микроб» штамма из этого очага со штаммами алтайского и гиссарского подвидов. В результате выявлена новая ДНК-мишень «Tal(-72)», обеспечивающая их дифференциацию. Эта мишень представляет собой участок гена YPO2412 (кодирует гипотетический белок) и включает делецию в 72 п.н. На нее рассчитаны праймеры, и определены условия проведения ПЦР (табл. 2). На основе анализа использованных в этой работе штаммов показано, что обнаруженная мутация выявляется только у штаммов из Таласского высокогорного очага и отсутствует у других подвидов (рисунок, Б).

Применение двух новых выявленных ДНК-мишеней – «Alt(-122)» и «Tal(-72)», наряду с ранее использованной генетической меткой штаммов *microtus* – делеции в 112 п.н. в регуляторном гене арабинозного оперона *araC*, обеспечивает дифференциацию всех штаммов алтайско-гиссарской



Дифференциация штаммов *Y. pestis* алтайско-гиссарской группы неосновных подвидов с праймерами на участки «Alt(-122)» (А) и «Tal(-72)» (Б):

Штаммы *Y. pestis*, основной подвид: 1 – Sonche, 2 – А100; кавказский подвид: 3 – 400, 4 – 16Д; улегейский подвид: 5 – И-3130, 6 – И-3131; гиссарский подвид: 7 – А-1725, 8 – А-1726, 9 – А-1731, 10 – А-1729, 11 – А-1633, 12 – А-1627, 13 – А-1724; алтайский подвид: 14 – КМ1205, 15 – И-2317, 16 – 6209, 17 – 4857; таласские штаммы: 18 – А-1818, 19 – А-1815, 20 – А-1817

группы штаммов. В ПЦР с праймерами на мишень «Alt(-122)» у штаммов алтайского подвида образуется фрагмент амплификации характерного размера в 90 п.н., в то время как у других штаммов алтайско-гиссарской группы, равно как и у штаммов основного и улегейского подвида, – размером 212 п.н. В ПЦР с праймерами на мишень «Tal(-72)» у всех штаммов *Y. pestis* образуется фрагмент размером 165 п.н., а у таласских штаммов – размером 93 п.н. С праймерами на мишень «aRaC(-112)» у всех штаммов *Y. pestis* амплифицируется фрагмент размером 814 п.н., а у штаммов *microtus* – 702 п.н. (табл. 2). Использование всех трех ДНК-мишеней обеспечивает быструю и простую дифференциацию близкородственных штаммов алтайского, гиссарского подвидов, штаммов *microtus* и таласских штаммов. Следует также отметить, что из двух штаммов алтайского подвида из Монголии, ни один не относился к этому подвиду. Один штамм принадлежал к штаммам *microtus*, а второй – к неизвестной группе. Это, возможно, свидетельствует о том, что штаммы алтайского подвида не имеют распространения на территории Монголии, а циркулируют преимущественно в Алтайском горном очаге чумы.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Одинок Г.Н., Куклева Л.М., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Структурно-функциональный анализ гена *araC* у штаммов *Yersinia pestis* различного происхождения. *Мол. генет.* 2009; 3:21–6.
2. Ерошенко Г.А., Одинок 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., эпидемиол. и иммунобиол.* 2012; 3:25–35.
3. Одинок Г.Н., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Определение генетических основ аутотрофности штаммов *Yersinia pestis* кавказского подвида. *Генетика.* 2012; 48 (4):457–65.
4. Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569-09. М.; 2009.

5. 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):577–82.

6. Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Biochemical and genetic peculiarities and the phylogenetic relationship of the non-main subspecies in the general scheme of the plague agent evolution. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954(1):45–51.

7. Zhou D., Tong Z., Song Y., Han Y., Pei D., Pang X., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., Jin L., Dai R., Du Z., Wang J., Guo Z., Wang J., Huang P., Yang R. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and proposal of a new biovar, *microtus*. *J. Bacteriol.* 2004; 186:5147–62.

References

1. Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Odinokov G.N., Kukleva L.M., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Kutyrev V.V. [Structural-functional analysis of *araC* gene in strains of *Yersinia pestis* of different origin]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2009; 3:21–6.
2. Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Kukleva L.M., Pavlova A.I., Krasnov Ya.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. [Standard algorithm for molecular typing of *Yersinia pestis* strains]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunol.* 2012; 3:25–35.
3. Odinokov G.N., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. [Determination of genetic foundation for auxotrophy in *Y. pestis* strains, spp. *Caucasica*]. *Genetika.* 2012; 48(4):457–65.
4. [Management of the laboratories using methods of nucleic acids amplification when working with the material containing microorganisms of the I–IV groups of pathogenicity. Methodological regulations]. МУ 1.3.2569-09. М.; 2009.
5. 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):577–82.
6. Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Biochemical and genetic peculiarities and the phylogenetic relationship of the non-main subspecies in the general scheme of the plague agent evolution. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954(1):45–51.
7. Zhou D., Tong Z., Song Y., Han Y., Pei D., Pang X., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., Jin L., Dai R., Du Z., Wang J., Guo Z., Wang J., Huang P., Yang R. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and proposal of a new biovar, *microtus*. *J. Bacteriol.* 2004; 186:5147–62.

Authors:

Nikiforov K.A., Odinokov G.N., Novichkova L.A., Eroshenko G.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

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

Поступила 09.07.14.