

А.В.Гаева, Е.Г.Булгакова, М.Н.Киреев, Л.В.Анисимова, Л.А.Новичкова, В.В.Кутырев

**ВНУТРИВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ОЧАГОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ШТАММОВ ЧУМНОГО МИКРОБА
МЕТОДОМ ВЫЧИТАЮЩЕГО РЕСТРИКЦИОННОГО ФИНГЕРПРИНТИНГА**

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Проведено генетическое типирование штаммов чумного микроба методом вычитающего рестрикционного фингерпринтинга (ВРФ). Показана возможность внутривидовой дифференциации и определения очаговой принадлежности изученных штаммов чумного микроба. В некоторых очагах циркулируют штаммы с разными ВРФ профилями, что предполагает возможность использования данного метода генетического типирования при исследовании локальных вспышек.

Ключевые слова: возбудитель чумы, генетическое типирование, вычитающий рестрикционный фингерпринтинг, внутривидовые различия.

Генетическое типирование штаммов чумного микроба в настоящее время активно реализуется с привлечением различных подходов [2, 4, 5, 8]. Традиционные методы типирования чумного микроба характеризуются различной, не всегда удовлетворительной, разрешающей способностью [3, 9]. Поэтому актуален поиск оптимальных методов и выбор наиболее удачного сочетания методов, на основе которых будет создан банк молекулярных портретов, позволяющий получать индивидуальные генетические характеристики штаммов и максимально полную картину генетической variability возбудителя чумы. С помощью методов молекулярного типирования можно получить штамм-специфические характеристики микроорганизмов, которые при исследовании вспышек инфекционных заболеваний позволяют устанавливать различия между клонально родственными (эпидемическими) и не родственными (спорадическими) штаммами, реконструировать пути распространения инфекции, определять источник инфекции [11]. Вычитающий рестрикционный фингерпринтинг относится к методам, позволяющим проводить типирование на основе ДНК полного генома бактерий и сочетает в себе преимущества макрорестрикционного анализа и метода полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (большое число разрешающих полос, высокая воспроизводимость). По данным V.Terletski *et al.* [12, 13], метод находит применение для распознавания изолятов и субклонов, дифференцирования близкородственных видов и подвидов бактерий. ВРФ успешно применен для исследования источников и распространения изолятов *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Agona* [7] и serovar *Derby* [6] в комплексной системе типирования, включающей определение плазмидного профиля, фаготипа, паттернов устойчивости к антибиотикам, *XbaI*- и *BlnI*-макрорестрикционных профилей. Показано, что разрешающая способность ВРФ сопоставима с таковой макрорестрикционного

анализа и зависит от выбора комбинации ферментов «детекции – вычитания» [10, 11, 13]. Высокие дискриминирующие свойства метода предполагают его перспективность для внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба.

Метод вычитающего рестрикционного фингерпринтинга основан на обработке геномной ДНК двумя ферментами рестрикции, последующим мечением концов фрагментов радиоактивными метками, избирательном захвате и удалении биотин меченных фрагментов ДНК стрептавидин-магнитными частицами (рис. 1).

«Детектирующий» фермент образует ТТАА концы, которые достраиваются дигоксигенин мечеными нуклеотидами для последующей детекции, в то время как «субтрактивный» («вычитающий») фермент образует GCGC концы, которые достраиваются биотинилированными нуклеотидами, что позволяет

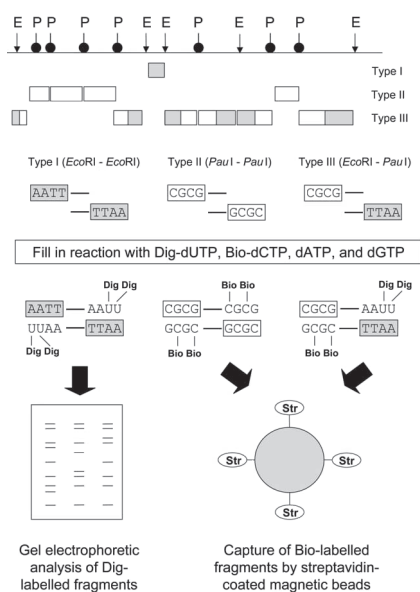


Рис. 1. Схема вычитающего рестрикционного фингерпринтинга (из статьи [11])

устранить данные фрагменты магнитными частицами со стрептавидином.

Обработка двумя рестриктазами, например, *EcoRI* (фермент детекции) и *Paul* (фермент вычитания) обеспечивает образование трех типов фрагментов, которые отличаются по их концам: фрагменты первого типа имеют только *EcoRI*-концы, фрагменты второго типа – *Paul*-концы, а фрагменты третьего типа несут с одного конца *Paul*-участок, с другого – *EcoRI*-участок. Следующий этап – заполнение «липких» концов полученных фрагментов ДНК. В образец добавляют смесь нуклеотидов рекомендованного состава и фермент Кленова. Фрагменты типа 2 и 3, имеющие, по крайней мере, один конец с последовательностью GCGC, включают биотинилированные dCTP и впоследствии удаляются связыванием со стрептавидиновыми магнитными частицами. Во фрагментах 1 типа оба конца помечены дигоксигенином. Эти фрагменты остаются в супернатанте после этапа связывания с магнитными частицами, далее разделяются электрофорезом в агарозном геле, и, после переноса на нейлоновую мембрану, детектируются иммунохимически анти-дигоксигениновыми антителами, конъюгированными со щелочной фосфатазой [11, 12].

Цель настоящей работы – выявление полиморфизма геномов штаммов чумного микроба разного происхождения методом вычитающего рестрикционного фингерпринтинга и получение их молекулярных портретов.

Материалы и методы

В работе использован 101 штамм *Yersinia pestis* разных подвидов, изолированных из природных очагов России и ближнего зарубежья. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Бактерии выращивали в течение 18 ч на агаре LB (pH 7,2) при 28 °С. Выделение ДНК проводили лизоцим-фенольным методом для грамотрицательных бактерий.

Обработку рестриктазами проводили согласно протоколу, представленному в статье [12]. Реакцию заполнения липких концов полученных фрагментов ДНК проводили добавлением фермента Кленова (0,4 ед.) и 2 µl смеси dNTP (40 µM dATP, 40 µM dGTP, 2 µM Dig-dUTP, 2 µM Bio-dCTP) при комнатной температуре в течение 10 мин. Не включившиеся нуклеотиды удаляли на колонках, заполненных Sephadex G-50 как описано [1]. Этап вычитания фрагментов рестрикции проводили с использованием стрептавидиновых магнитных частиц («Roche», Германия). Подготовка магнитных частиц, условия инкубирования реакционной смеси осуществляли согласно протоколу в статье [12]. После инкубирования микропробирки помещали в магнитную подставку («Amersham», Великобритания), отбирали супернатант. Далее образцы очищали от избытка солей на колонках, заполненных Sephadex G-50 и доводили до

объема 10 µl в аппарате для лиофилизации («Alpha I-5», ФРГ).

Образцы разделяли электрофорезом в пластинах 1,2 % агарозного геля, в качестве маркеров молекулярного веса использовали ДНК фага λ, обработанную ферментами *EcoRI* - *HindIII*. После электрофореза гель обрабатывали денатурирующим щелочным раствором, содержащим 1 М NaCl и 0,5 М NaOH и затем нейтрализовали раствором 1М NaCl и 0,5 М ТрисHCl до pH 7,5 в течение 30–40 мин.

Перенос фрагментов ДНК на нейлоновую мембрану Hybond N⁺ («Amersham», Великобритания) в течение 1 ч осуществляли с использованием 10х буфера SSC в приборе «Transvac» («Hoefer», США).

Детекцию дигоксигенин-меченных фрагментов на мембране проводили коммерческим набором DIG DNA Labeling and Detection Kit («Roche», Германия) согласно протоколу. Полученные изображения сканировали, сохраняли в формате TIFF.

Результаты и обсуждение

Нами изучена возможность генетического типирования штаммов чумного микроба методом вычитающего рестрикционного фингерпринтинга, позволяющим выявлять полиморфизм длины рестрикционных фрагментов полного генома бактерий.

Поскольку число фрагментов, оставшихся для электрофоретического разделения в геле, зависит от частоты расщепления ферментов детекции и вычитания, необходимо выбрать комбинацию ферментов рестрикции, которая потенциально пригодна для ВРФ типирования чумного микроба.

На первом этапе проведен поиск комбинации ферментов детекции и вычитания, дающей высокий индекс различия для штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов. Ферментом детекции была выбрана эндонуклеаза *EcoRI* по рекомендации авторов метода [11]. Определение количества сайтов узнавания для ферментов вычитания проводили на известных нуклеотидных последовательностях геномов штаммов чумного микроба биовара *orientalis* (CO92, AL 590842), биовара *medievalis* (KIM, AE 009952) и псевдотуберкулезного микроба IP32953 (NC_006155) (база данных NCBI GenBank). Для этого в программе Gene Runner выбрана функция Analysis/Nucleic acid/Restriction sites. Из представленного списка эндонуклеаз отобраны те, которые образовывали липкие концы из четырех нуклеотидов состава G/C. Всего было изучено 26 ферментов вычитания с различной частотой расщепления геномной ДНК чумного микроба. Теоретически близкое и приемлемое для разделения и анализа в агарозном геле количество фрагментов (от 30 до 50) дают комбинации ферментов *EcoRI* - *Cfr10I*, *EcoRI* - *Paul*, *EcoRI* - *MluI*, *EcoRI* - *Eco52I*, *EcoRI* - *Kpn2I*. Эти пары ферментов тестировали на 6 референтных штаммах чумного микроба: И3205 (основной подвид), 1146 (кавказский подвид), А1633 (гиссарский подвид), И2359 (алтайский под-

вид), И3069 (улегейский подвид), А1814 (таласская группа). Со всеми парами ферментов выявлены внутривидовые различия в количестве и расположении детектируемых полос. Однако при действии пары эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* - *Cfr10I* наблюдали большое количество близко расположенных полос в треках, что затрудняло учет результатов, использование комбинации *EcoRI* - *Kpn2I* выявило незначительные различия между штаммами и также отмечалось большое количество фрагментов.

Для типирования расширенной выборки штаммов использовали комбинацию ферментов *EcoRI* - *PauI*, поскольку с данной парой рестриктаз получали оптимальную картину профилей. Анализировали четко дифференцируемые полосы в диапазоне 2000–400 п.н. Полученные картины фингерпринтов распределения фрагментов ДНК представлены в виде схемы (рис. 2, 3).

На следующем этапе исследования было проведено генетическое типирование 9 штаммов основного подвида (*Y. pestis ssp. pestis*) выделенных из 9 природных очагов (по одному штамму из очага): Аксайского высокогорного (231(708)), Забайкальского степного (И1270), Тувинского горного (И3205), Джейранчельского равнинно-предгорного (КМ872(С527)), Прикаспийского песчаного (С528), Центрально-Кавказского высокогорного (С631), Волго-Уральского песчаного (М956), Приаральско-Каракумского пустынного (А1763), Хэнтэйского аймака Монголии (И3102). Штаммы основного подвида образовали группу из девяти геновариантов, причем каждый геновариант соответствовал отдельному природному очагу (рис. 2). Различия ВРФ профилей штаммов основного подвида отмечаются в диапазоне 700–1300 п.н. Так, у штамма из Тувинского горного очага присутствовали два фрагмента размером 700 и 1100 п.н. (рис. 2, дорожка 3). ВРФ профиль штамма из Центрально-Кавказского высокогорного очага содержал фрагменты размером 1000 и 1200 п.н. и не обнаружил фрагмента 1300 п.н. (рис. 2, дорожка 4). Штамм из Аксайского высокогорного очага характеризовался наличием большего числа фрагментов в области 1000–1200 п.н. (рис. 2, дорожка 1). Штамм КМ872 из Джейранчельского равнинно-предгорного очага оказался близок к штаммам кавказского подвида по характеру распределения фрагментов в области 1400–1300 п.н. (рис. 2, дорожка 5, рис. 3, К). ВРФ профили штаммов Прикаспийского песчаного, Волго-Уральского песчаного и Приаральско-Каракумского пустынного очагов отличались незначительно (наличием/отсутствием фрагмента размером около 1000 и 500 п.н.) (рис. 2, дорожки 6, 7, 8). Штаммы из Монголии (рис. 2, дорожка 2) и Забайкальского степного очага (рис. 2, дорожка 9) различались ВРФ профилями в области 700–900 п.н. Штаммы алтайского подвида образовали два типа ВРФ-профилей: один геновариант включал штаммы из Алтайского горного очага (2183, 2817, И2998, И2359, И3000), второй геновариант – штамм из Монголии (И3086) – отлич-

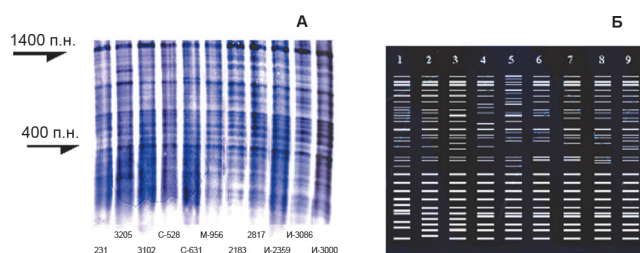


Рис. 2. ВРФ профили штаммов чумного микроба основного и алтайского подвида (А) и схема ВРФ паттернов штаммов основного подвида из разных природных очагов (Б):

1 – 231(708) (Аксайский), 2 – И3102 (Монголия), 3 – И3205 (Тувинский), 4 – КМ921(С631) (Центрально-Кавказский), 5 – КМ872 (С527) (Джейранчель), 6 – КМ873(С528) (Прикаспийский песчаный), 7 – М956 (Волго-Уральский песчаный), 8 – А1763 (Приаральско-Каракумский), 9 – И1270 (Забайкальский)

чался наличием дополнительного фрагмента около 850 п.н. (рис. 3, А). Геновариант штаммов улегейского подвида из аймака Убурхангай (И3068, И3069) отличался от геноварианта штаммов того же подвида из Южно-Гобийского аймака (И3130, И3071) отсутствием фрагмента 1300 п.н. (рис. 3, У). Штаммы кавказского подвида отличаются ВРФ профилем от штаммов остальных подвида иной картиной распределения фрагментов в области 1300–1600 п.н., при этом штамм из Зангезуро-Карабахского горного очага (1146) отличался ВРФ профилем от штамма из Приараксинского низкогорного очага (818) наличием фрагмента около 950 п.н. (рис. 3, К). Штаммы гиссарского подвида (6 штаммов) и таласские штаммы (3 штамма) показали мономорфность ВРФ – профилей и образуют по одному геноварианту (рис. 3, Г, Т).

Выявленные различия в геновариантах основного и кавказского подвида из разных природных очагов послужили основанием для исследования расширенной выборки штаммов, циркулирующих в разных природных очагах с целью изучения распространения в них ВРФ профилей. Штаммы основного подвида выбраны из очагов разных типов: пустынного (Мангышлакский, Муянкумский, Северо-Приаральский, Приаральско-Каракумский), равнинно-предгорного (Терско-Сунженский), высокогорного и горного (Верхненарынский, Сарыджазский, Аксайский, Алайский, Тувинский),

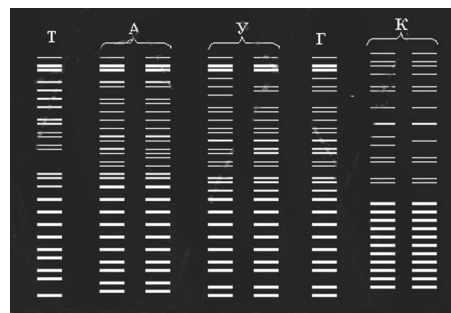


Рис. 3. Схема ВРФ паттернов штаммов чумного микроба неосновных подвида:

Т – группа таласских штаммов, А – алтайский подвид, У – улегейский подвид, Г – гиссарский подвид, К – кавказский подвид

степного (Прикаспийский песчаный). В выборку были включены штаммы кавказского подвида из Присеванского горного, Ленинанканского горного, Зангезуро-Карабахского горного очагов. При изучении распределения геновариантов нами определены вариации ВРФ профилей штаммов чумного микроба. Так, штаммы основного подвида, выделенные из различных природных очагов (Джейранчельский равнинно-предгорный, Тувинский горный, Сарыджазский высокогорный, Муонкумский пустынный, Прикаспийский песчаный), обнаружили различные геноварианты, соответствующие отдельно природному очагу. Штаммы Верхненарынского, Аксайского и Алайского очагов не различались и представляют отдельный геновариант. При генотипировании 6 штаммов из Терско-Сунженского очага нами выявлено два геноварианта: выделенные в 1970 г. штаммы от блох малого суслика (относятся к основному подвиду) отличались наличием фрагментов в областях 1300–1000 п.н. и 500–800 п.н. и отсутствием фрагмента 800 п.н. от штаммов, выделенных в 1979 г. от обыкновенной полевки (относятся к кавказскому подвиду). Дифференцировались по ВРФ профилю и штаммы кавказского подвида из Присеванского, Ленинанканского, Зангезуро-Карабахского горных очагов. В некоторых пустынных очагах выявлена гетерогенность ВРФ профилей: из четырех штаммов Приаральско-Каракумского очага два штамма (4635, 1252) были идентичны по генотипу, а два других (550, A1763) составили отдельные ВРФ профили, в Мангышлакском очаге штамм M489 отличался от остальных из данного очага по двум дополнительным фрагментам размерами около 900 п.н. и 800 п.н., в Северо-Приаральском очаге штамм 617 не имел фрагмента 1300 п.н. Таким образом, у штаммов Северо-Приаральского, Мангышлакского очагов выявлено по 2 геноварианта, а штаммов Приаральско-Каракумского очага – 3 геноварианта.

В результате проведенной работы показано, что каждому подвиду чумного микроба соответствуют строго определенные ВРФ профили. Более того, в большинстве случаев по ВРФ профилю можно установить очаговую принадлежность штамма. Приведенные результаты на молекулярно-генетическом уровне подтверждают справедливость деления штаммов чумного микроба на подвиды и показывают неоднородность подвидов, коррелирующую с очаговой принадлежностью. Необходимо отметить, что тестирование других комбинаций ферментов «детекции-вычитания» позволит повысить разрешающую способность метода и обеспечит получение молекулярных портретов штаммов из всех природных очагов и мезоочагов, что повысит эффективность эпидемиологического мониторинга при установлении источника распространения инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 479 с.
2. Guiyoule A., Grimont F., Itean L., Grimont P. A., Lefevre M., Carniel E. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. J. Clin Microbiol. 1994; 32:634–41.
3. Huang X-Z., Chu M., Engelthaler D., Lindler L. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. J. Clin. Microbiol. 2002; 40(4):1164–73.
4. Kingston J., Tuteja U., Kapil M., Murali H. S., Batra H. V. Genotyping of Indian *Yersinia pestis* strains by MLVA and repetitive DNA sequence based PCRs. Antonie van Leeuwenhoek. 2009; DOI 10.1007/s10482-009-9347-2.
5. Li Y., Dai E., Cui Y., Li M., Zhang Y., Wu M. et al. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. PLoS ONE. 2008; 3(5):e2166.
6. Michael G., Cardoso M., Rabsch W., Schwarz S. Phenotypic and genotypic differentiation of porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby isolates. J. Vet. Microbiol. 2006; 118:312–8.
7. Michael G., Cardoso M., Schwarz S. Molecular analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from slaughter pigs. J. Vet. Microbiol. 2006; 112:43–52.
8. Pourcel C., Andre-Mazeaud F., Neubauer H., Ramiise F., Vergnaud G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. BMC Microbiol. 2004; 4:22.
9. Revazishvili T., Rajanna C., Bacanidze L., Tsertsvadze N., Imnadze P., O'Connell K. Characterization of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. J. Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14(5):429–36.
10. San Millán R., Garaizar J., Bikandi J. In silico simulation of fingerprinting techniques based on double endonuclease digestion of genomic DNA. In Silico Biology. 2005; 5(3):341–6.
11. Terletski V., Michael G.B., Schwartz S. Subtracted restriction fingerprinting – a new typing technique using magnetic capture of tagged restriction fragments. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2004; 41:1–8.
12. Terletski V., Schwartz S., Carnwath J. Subtracted restriction fingerprinting – a tool for bacterial genome typing. BioTechniques. 2003; 34:304–13.
13. Terletski V., Schwarz S., Carnwath J., Niemann H. Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars *Choleraesuis*, *Typhimurium*, Dublin and laboratory strains of *Escherichia coli* using subtracted restriction fingerprinting (SRF) Microbiol. Res. 2003; 158:135–42.

A.V.Gaeva, E.G.Bulgakova, M.N.Kireev, L.V.Anisimova,
L.A.Novichkova, V.V.Kutyrev

**Intra-Species Differentiation and Determination
of the Focal Belonging of Plague Microbe Strains
Using Subtracted Restriction Fingerprinting**

Russian Anti-Plague Research Institute «Microbe», Saratov

Plague microbe strains were typed using subtracted restriction fingerprinting (SRF). Intra-species differentiation and determination of the focal belonging of the studied plague microbe strains was demonstrated. Strains with different SRF patterns circulate in some foci suggesting the possibility to use this genetic typing method for local outbreaks investigation.

Key words: plague agent, subtracted restriction fingerprinting, intra-species diversity.

Об авторах:

Гаева А.В., Булгакова Е.Г., Киреев М.Н., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Gaeva A.V., Bulgakova E.G., Kireev M.N., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe». 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Получена 10.09.10.