

М.Е.Платонов¹, В.В.Евсеева¹, Д.В.Ефременко², И.В.Кузнецова², Е.В.Чиркова¹, С.В.Дентовская¹,
А.Н.Куличенко², А.П.Анисимов¹

DFR-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ СНГ

¹ФГУЗ «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk;

²ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

С помощью DFR-типирования [6] набора из 275 штаммов *Y. pestis*, выделенных преимущественно в природных очагах чумы стран СНГ, определены «геномолары» (DFR-типы), характерные для 27 очагов. Выявлено 64 новых DFR-типа *Y. pestis* (из 96, описанных к настоящему времени) и установлено, что на территории стран СНГ и в Монголии циркулирует не менее 56 геномоларов. Показано, что все исследованные методом DFR-типирования штаммы кластеризуются в соответствии с филогенетической схемой, предложенной на основании данных сочетанного SNP- и IS100-типирования [1], и дифференцируются до уровня подвидов, популяций и даже штаммов, циркулирующих на территории определенных природных очагов.

Ключевые слова: DFR-типирование, *Yersinia pestis*.

M.E. Platonov, V.V. Evseeva, D.V. Efremenko, I.V. Kuznetsova, E.V. Chirkova, S.V. Dentovskaya,
A.N. Kulichenko, A.P. Anisimov

DFR-Typing of *Yersinia pestis* Strains from the CIS Natural Foci

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk;
Stavropol Research Anti-Plague Institute

Different region analysis (DFR-typing) was used for characterization of 275 *Y. pestis* strains isolated mainly from the CIS natural plague foci. Genomovars (DFR-types) endemic for 27 natural foci were determined. In addition to 32 genomovars described previously 64 novel *Y. pestis* DFR-types were revealed. 56 genomovars were shown to circulate in CIS and Mongolia. All strains analyzed by DFR-typing, were clustered in accordance with the phylogenetic tree proposed on the basis of combined SNP- and IS100-typing data. The discriminatory ability of the method is high enough to distinguish between subspecies, populations and even strains circulating in certain natural plague focus.

Key words: DFR-typing, *Yersinia pestis*.

Относительно недавнее возникновение и микроэволюционирование *Y. pestis* [1] объясняет низкую степень внутривидового разнообразия и затрудняет быструю и надежную фенотипическую дифференциацию отдельных штаммов патогена [2, 5], необходимую не только для целей молекулярной эпидемиологии, но и для лучшего понимания механизмов возникновения *Y. pestis* и распространения чумы. Все методы генотипирования основаны на анализе фрагментов нуклеиновых кислот, различающихся у близкородственных штаммов [4]. Внедрение в практику здравоохранения современных методов генотипирования обеспечивает получение воспроизводимых данных, позволяющих не только различать внутривидовые группы, но и отдельные штаммы *Y. pestis* и даже линии штаммов, поддерживаемые в различных лабораториях.

В геноме *Y. pestis* с помощью сравнительного анализа полногеномных последовательностей *in silico*, сравнительной гибридизации геномов с помощью технологии ДНК-микроэрезов и вычитающей гибридизации было выявлено 23 локуса, по наличию которых отличаются штаммы одного вида (different region – DFR), и была разработана технология генотипирования *Y. pestis*, основанная на учете присутствующего в штамме набора DFR. При исследовании 909 природных изолятов было показано, что на территории 13 природных очагов Китая

циркулируют штаммы 32 «геномоларов» (DFR-типов), причем для каждого очага характерен свой основной DFR-тип [6].

В настоящей публикации описано DFR-типирование набора штаммов *Y. pestis*, выделенных преимущественно в природных очагах стран СНГ и Монголии.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовали 275 штаммов *Y. pestis*. DFR-профили 205 штаммов определены в настоящем исследовании экспериментально, аналогичные данные о 48 штаммах взяты из работы [6], а DFR-профили 22 штаммов *Y. pestis* и штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 получены в результате анализа *in silico* полногеномных нуклеотидных последовательностей, доступных в Интернете. Так как DFR01, DFR02 и DFR03 входят в состав плазмиды pFra [8], то для генотипирования использовали только штаммы, содержащие эту плазмиду. Бактерии выращивали на агаре Хоттингера с добавлением 1 % гемолизированной крови в течение 48 ч при температуре 28 °С. Геномную ДНК выделяли в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганиз-

мами I–II групп патогенности» с использованием комплекта реагентов для выделения ДНК из биопроб производства НПФ «Литех».

Праймеры и ПЦР. Последовательности 23 пар DFR-праймеров и rFra-специфичных праймеров, а также условия проведения ПЦР детально описаны Y.Li *et al.* [6].

Анализ результатов. DFR-анализ штаммов *Y. pestis* проводили, как описано ранее [6]. Положительные и отрицательные результаты амплификации фиксируют как «1» и «0» соответственно, что

свидетельствует о наличии или отсутствии определенного DFR. Полученные результаты вносят в базу данных программы Bionumerics 5.1 (Applied Math NV, Бельгия). Для построения дендрограмм используют метод Neighbor-Joining с коэффициентом Dice для бинарных данных с представлением отдельных DFR-профилей в виде кубиков. При построении дерева в качестве корневого вида использовали штамм *Y. pseudotuberculosis* IP32953. Наименования природных очагов чумы даны в соответствии с публикациями [2, 6].

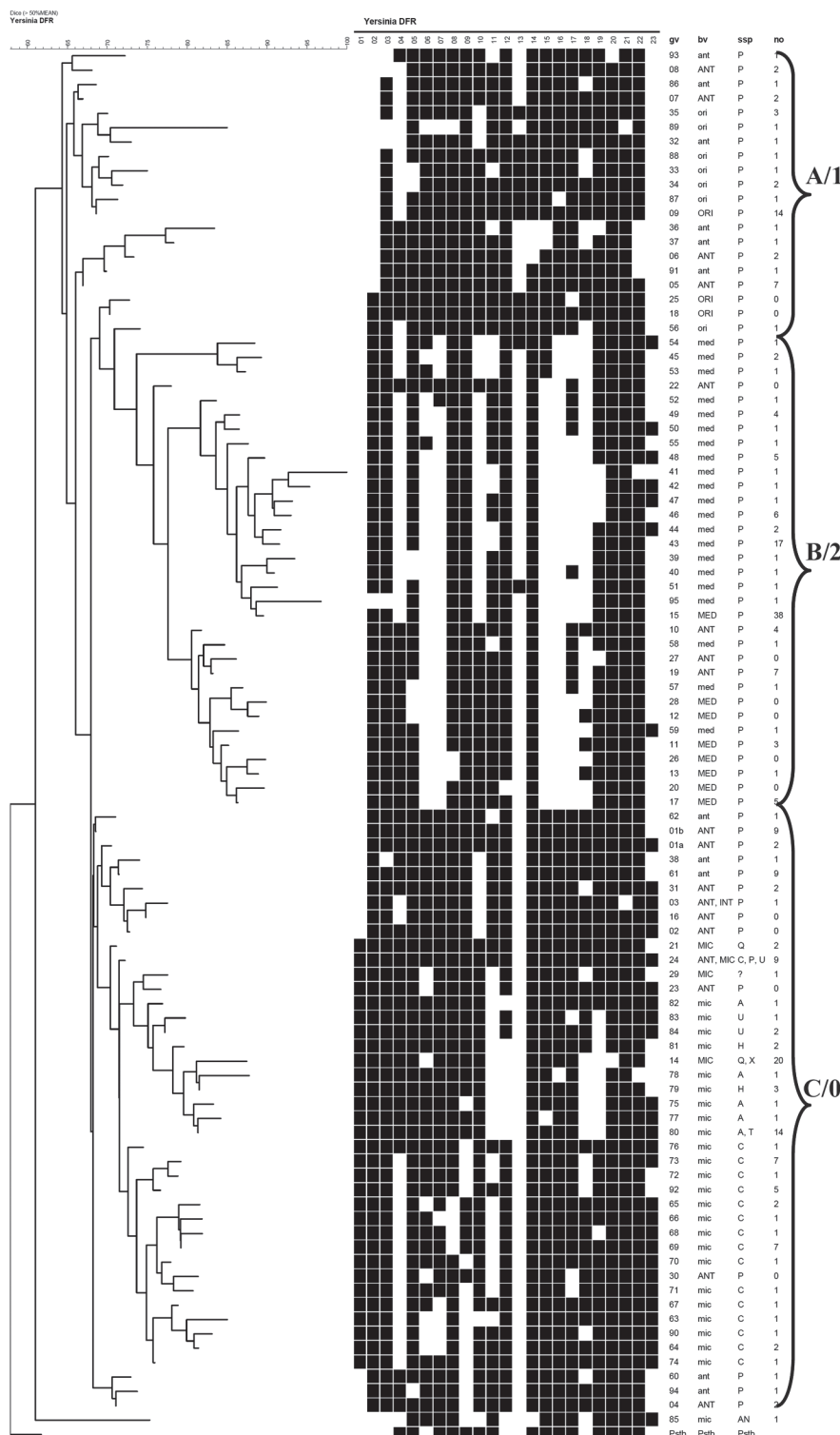


Рис. 1. NJ-дендрограмма и DFR-профили 96 геномов *Y. pestis*:
gv – геномов; bv – биовар; ANT – antiqua (заглавные буквы обозначают, что геномов описан ранее); INT – intermediate; med – medialis; mic – microtus; ori – orientalis; ssp – подвида (обозначены первой буквой названий, а в случае subsp. *angola* – двумя первыми буквами); no – количество штаммов, проанализированных в нашей работе; ? – нет данных. Черные квадраты указывают на наличие DFR (*Yersinia* DFR 01–23)

Результаты и обсуждение

На основании анализа DFR-профилей 275 штаммов *Y. pestis* нам удалось подразделить все исследованные к настоящему моменту изоляты на 96 DFR-типов (64 из них описаны нами впервые). На территориях стран СНГ и в Монголии циркулируют, как минимум, 56 геномов. DFR-профили и NJ-дендрограмма 96 геномов представлены на рис. 1. Большинство геномов вошли в состав трех кластеров: А, В и С [6], соответствующих основным ветвям 1, 2 и 0 дендрограммы, построенной M.Achtman *et al.* [1] на основании данных SNP- и IS100-типирования. Более поздняя версия SNP-дендрограммы, по данным A.Derbise *et al.* [3], представлена на рис. 2. В нашем исследовании вне кластеров остался африканский «полевочий» штамм subsp. *angola* – Angola, что может свидетельствовать как о его относительно древнем происхождении, так и об отсутствии среди анализируемых изолятов других филогенетически близких ему штаммов. Как и в публикации наших китайских коллег [6], все штаммы биовара *orientalis* (24 штамма в составе 10 геномов) вошли в состав кластера А/1, все штаммы биовара *medievalis* (98 штаммов в составе 29 геномов) – в кластер В/2, а представители биовара *microtus* (неосновные подвиды *Y. pestis* [5]) (91 штамм в составе 27 геномов), за исключением геномвара 85, представленного штаммом Angola, – в кластер С/0. Штаммы биовара *antiqua* (64 штамма в составе 29 геномов) распределились по различным ветвям кластеров А/1, В/2 и С/0.

В состав кластера В/2 входят две основные ветви (рис. 1). Одна из ветвей соответствует ветви 2.ANT на рис. 2 и представлена в основном геномварами, циркулирующими на территориях Китая и Монголии (например, 10–13, 26–28, 62 и др.), а также геномваром 19 – основным DFR-типом в граничащем с Китаем и Монголией природном очаге 38 и минорным для Монголии, Китая и Непала, а также удаленно расположенного Центрально-Кавказского высокогорного очага. В эту же ветвь входят минорные геномвары 57 и 59 из природного очага 1.

Вторая ветвь соответствует ветви 2.MED на

рис. 2 и образована, в основном, DFR-типами, характерными для природных очагов стран СНГ. Она включает геномвар 15 – основной DFR-тип штаммов биовара *medievalis*, циркулирующих в природных очагах Средней Азии.

Все изученные нами штаммы биовара *orientalis* вошли в состав кластера А/1 и были выделены за пределами СНГ, Монголии и Китая. В этот же кластер вошли штаммы биовара *antiqua*, циркулирующие на территории Монголии (геномвар 01b (минорный DFR-тип для китайских очагов В1, С, D, G и К2) – четыре штамма, геномвар 62 – один штамм) и стран СНГ в природных очагах: 31 (основной для соседнего китайского очага А [6] геномвар 04 – один штамм), 33 (геномвар 60, отличающийся от геномвара 04 отсутствием DFR18, – один штамм) и 37 (геномвар 61 – девять штаммов, геномвар 01b – один штамм), 40 (геномвар 01b – два штамма, геномвар 04 – один штамм, геномвар 93 – один штамм, 94 – один штамм), 46 (геномвар 01b – один штамм). В состав этого кластера входят и штаммы геномвара 03 биовара *intermedium*, циркулирующие в китайском очаге В3. Кластер включает две основные ветви, одна из которых (DFR-типы: 07–09, 32–35, 56, 86–89) соответствует ветви 1.ORI на рис. 2, а остальные геномвары в составе второй ветви – 1.ANT.

Кластер С/0 формировали две основные ветви (рис. 1), одна из которых включала геномвар 90 (ветвь 0.PE2 на рис. 2), а вторая DFR-типы 14 и 80 (ветвь 0.PE4 на рис. 2).

В 0.PE2 ветвь, кроме DFR-типа 90, входили геномвары: 24 (минорный геномвар штаммов bv. *antiqua* subsp. *pestis* из китайского очага С; основной – для subsp. *ulegeica* (семь штаммов из Монголии) и минорный для subsp. *caucasica* (по одному штамму из очагов 5 и 7)); 63, 67, 70, 71, 74, 72, 76 (по одному штамму subsp. *caucasica* из очагов 6, 7, 4, 4, 39, 39, 5 соответственно); 64 (по одному штамму subsp. *caucasica* из очагов 6 и 7), 92 (пять штаммов из очага 39) и основной для очага 39 геномвар 73 (семь штаммов subsp. *caucasica*).

Ветвь 0.PE4 более разнообразна по входящим в нее подвидам. Сюда вошли геномвары 62, 23, 30 основного подвида биовара *antiqua* из Монголии и Китая. Большинство входящих в группу 0.PE4 штаммов биовара *microtus* обладало DFR-типом 14 – основным геномваром китайских подвидов *qinghaiensis* и *xilingolensis*, который также оказался характерным для трех монгольских штаммов, относимых к подвиду *altaica*. В случае выявления близкого родства этих штаммов и с помощью других методов молекулярного типирования следует поставить вопрос о тщательной проверке всех коллекционных штаммов подвида *altaica*, выделенных в Монголии, на предмет их перевода в соответствующий внутривидовой таксон. Геномвар 80 – основной для штаммов подвида *altaica*, выделенных в очаге 36 (12 штаммов) и в Монголии (один штамм). К этому же

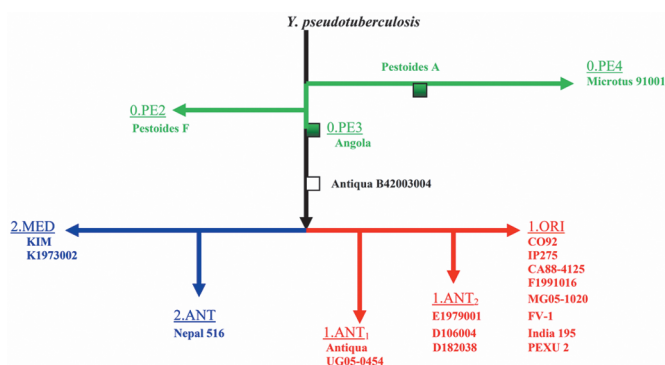


Рис. 2. Дендрограмма микроэволюции 21 штамма *Y. pestis* по данным SNP типирования [4]

геномвару относится и единственный в нашем исследовании представитель подвида *talassica* A-1820. Штамм *Pestoides* A относится к этому же DFR-типу и, вероятно, является представителем подвида *altaica* или *talassica*. Штаммы subsp. *caucasica* геномвара 69 циркулируют в очагах 4 (два штамма), 5 (два штамма) и 7 (один штамм). Остальные входящие в ветвь 0.РЕ4 геномвары представлены одним – двумя штаммами подвидов *hissarica*, *altaica*, *caucasica* и *ulegeica*.

Таким образом, определение профилей 23 DFR позволило сгруппировать 275 штаммов *Y. pestis* в 96 геномваров. Для штаммов биоваров *orientalis*, *medievalis* и *microtus* характерны биовар-специфичные DFR-профили, и каждый из биоваров образует свой отдельный кластер. В то же время штаммы разных геномваров биовара *antiqua* распределены по различным ветвям кластеров A/1, B/2 и C/0. Маловероятно, что совпадение DFR-типов (03 и 24) у штаммов из географически изолированных природных очагов и разных внутривидовых групп (рис. 1) связано с их заносом с одной территории на другую. Скорее это совпадение можно объяснить независимой утратой амплифицируемых локусов или участков «посадки» праймеров и даже ошибками, допущенными при проведении коллекционной работы со штаммами. С другой стороны, совпадение DFR-типов у представителей фенотипически близких подвидов *xilingolensis* и *qinghaiensis* (DFR14), а также *altaica* и *talassica* (DFR30) [5] может свидетельствовать и об их близком генетическом родстве. Верификация полученных нами результатов с помощью других методов мультилокусного генотипирования (MLVA, CRISPR-типирование и др.) поможет ответить на эти вопросы. Косвенным подтверждением высокой разрешающей способности метода молекулярного типирования с использованием 23 DFR-локусов и корректности распределения отдельных внутривидовых групп *Y. pestis* по кластерам и отдельным ветвям дендрограммы является недавняя публикация G. Morelli *et al.* [7], в которой сходное по структуре филогенетическое дерево для 282 штаммов *Y. pestis* было построено на основании типирования по 933 SNP-локусам. И на их филограмме значительное разнообразие характерно именно для входящих в состав ветви 0 наиболее древних внутривидовых групп *Y. pestis*.

Работа выполнена по государственному контракту № 53-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

Выражаем глубокую благодарность Иркутскому научно-исследовательскому противочумному институту Сибири и Дальнего Востока за предоставленные штаммы возбудителя чумы (использованные ранее в совместных исследованиях по мультилокусному VNTR-типированию).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B. *et al.* Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(51):17837–42.
2. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(2):434–64.
3. Derbise A., Chenal-Francisque V., Huon C., Fayolle C., Demeure C.E., Chane-Woon-Ming B. *et al.* Delineation and analysis of chromosomal regions specifying *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2010; 78(9):3930–41.
4. Foley S.L., Lynne A.M., Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 2009; 9(4):430–40.
5. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y. *et al.* Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS ONE* 2009; 4(6):e6000.
6. 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.
7. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M. *et al.* *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3.
8. Zhou D., Han Y., Song Y., Tong Z., Wang J., Guo Z. *et al.* DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15):5138–46.

Authors:

Platonov M.E., Evseeva V.V., Chirkova E.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Платонов М.Е., Евсеева В.В., Чиркова Е.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболенск, Московская обл. E-mail: platonov@obolensk.org

Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 02.02.11.