

В.В.Сутягин¹, Т.В.Мекка-Меченко², О.В.Когай¹, А.Т.Бердибеков¹**ДЛИТЕЛЬНОСТЬ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОВ ЧУМНОГО МИКРОБА (*YERSINIA PESTIS*) В КОСТНЫХ ОСТАНКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**¹РГУ «Талдыкорганская противочумная станция», Талдыкорган, Республика Казахстан; ²Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М.Айкимбаева, Алматы, Республика Казахстан

Цель работы. Определение длительности сохранения ДНК чумного микроба в костной ткани грызунов и его количественной динамики во времени под воздействием биотических (ДНК-азы посторонней микрофлоры) и абиотических (изменяющиеся влажность, температура, инсоляция) факторов. **Материалы и методы.** Невозможность в большинстве случаев провести датировку подобного полевого материала, приводит к снижению его информативности. О длительности сохранения капсульного антигена (FI) чумного микроба, выявляемого серологическим методом, в погадках и костях и динамики его снижения известно из более ранних исследований. После гибели подопытных животных, зараженных вирулентным штаммом чумного микроба, их скелеты освобождали от мягких тканей и помещали в условия, приближенные к естественным. Исследование костных останков на наличие в них фрагментов ДНК чумного микроба проводили непосредственно после гибели животных, а затем дважды в год. **Результаты и выводы.** Полученные данные позволили все костные останки павших от чумной инфекции млекопитающих условно разделить на три группы: с высоким, средним и низким содержанием бактерий. Дальнейшее их исследование показало, что через полгода в костной ткани животных снижения концентрации ДНК возбудителя чумы не происходит. После одного года зафиксировано резкое снижение (в 100 раз) наблюдаемых разведений материала, при которых еще возможно обнаружение детектируемых плазмид. Через полтора года наблюдений генов чумного микроба в костях экспериментальных животных обнаружить не удалось. С целью увеличения информативности при исследовании такого типа материала предложено воссоздать систему смотровых площадок по сбору погадок и костных останков млекопитающих.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, ПЦР, ДНК, плазмидные гены, костные останки, погадки.

Корреспондирующий автор: Виталий Владимирович Сутягин, e-mail: tpcstald@mail.ru.

V.V.Sutyagin¹, T.V.Mekka-Mechenko², O.V.Kogay¹, A.T.Berdibekov¹**Duration of Conservation of Plague Microbe (*Yersinia pestis*) Genes in Mammalian Bone Remains**¹"Taldykorgan Plague Control Station", Taldykorgan, Republic of Kazakhstan; ²M.Aykimbaev Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Infections, Almaty, Republic of Kazakhstan

Objective of this work was to determine the long-term preservation of *Yersinia pestis* DNA, detected by polymerase chain reaction (PCR) in the bone tissue of rodents, and to quantify content changes over time under the influence of biotic and abiotic factors. **Materials and methods.** After death of model animals infected with virulent *Y. pestis* strain, their skeletons were freed from soft tissues and placed in the environments where conditions were close to the natural ones. The study of bone remains for the presence of *Y. pestis* DNA fragments was held immediately after the death of the animals, and then, twice a year. **Results and conclusions.** The data obtained allow for dividing all the fossil remains of the fallen from plague infection mammals into three separate groups: with high, medium, and low content of bacteria. Further study demonstrates that reduction of *Y. pestis* DNA concentration in bone tissue of animals after six months of storage does not occur. After a year, a sharp decrease (100-fold) of observable material dilutions for which the identification of detected plasmids is still possible, is registered. After one and a half year of observation, the genes of plague microbe in the bones of experimental animals could not be found. In order to increase the information content of the study of this type of material put forward has been proposal to reestablish the system of observation sites to collect castings and bone remains of mammals.

Keywords: *Yersinia pestis*, PCR, DNA, plasmid genes, bone remains, castings.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Vitaly V. Sutyagin, e-mail: tpcstald@mail.ru.

Citation: Sutyagin V.V., Mekka-Mechenko T.V., Kogay O.V., Berdibekov A.T. Duration of Conservation of Plague Microbe (*Yersinia pestis*) Genes in Mammalian Bone Remains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:85–87. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-85-87

В последнее время в практику эпизоотологического обследования природных очагов чумы прочно вошел метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако его место и роль среди различных лабораторных методов все еще остаются недостаточно определенными. Притом, что исследовать с помо-

щью полимеразной цепной реакции можно весь перечень материала, поступающего в лаборатории противочумных станций, тем не менее, сам метод накладывает определенные ограничения на хранение и транспортировку исследуемых образцов.

Погадки хищных птиц и костные останки мле-

копитающих, являясь одним из индикаторов протекания эпизоотий, перед поступлением в лабораторию довольно длительное время могут находиться на земной поверхности, подвергаясь таким образом неблагоприятному воздействию природно-климатических факторов. Исследовать же подобный материал возможно лишь двумя методами: серологическим и ПЦР.

Между тем известно, что стабильность биологических молекул во времени существенно варьирует. Они претерпевают драматические постмортальные изменения даже в тех случаях, когда тела организмов достаточно хорошо сохранились. В условиях, близким к физиологическим, вероятность сохранения ДНК очень ничтожна. Молекулы ДНК чрезвычайно восприимчивы к окислительным и гидролитическим повреждениям, любые изменения быстро ее дестабилизируют, образуя одонитевые разрывы. Поэтому непосредственно после смерти молекулы ДНК быстро распадаются, и этот процесс начинается с автолиза [3].

Проводя анализ костных останков из древних захоронений людей [4–7] на наличие в них следов чумного микроба, следует учитывать, что данный материал находился длительное время в «законсервированном» состоянии (при достаточно низкой температуре без значительных колебаний, а также без воздействия солнечной инсоляции и изменяющейся влажности).

О длительности сохранения капсульного антигена (FI) возбудителя чумы, выявляемого серологическим методом, в погадках и костях, находящихся в естественных природных условиях, известно из экспериментальных работ, проводимых, в том числе и на Талдыкорганской противочумной станции [1]. О длительности сохранения и индикации ДНК чумного микроба в погадках и костных останках млекопитающих, а также динамики их снижения во времени на территории Среднеазиатского пустынного очага чумы информации нет.

В связи с вышеизложенным нами в 2014 г. были начаты работы по применению метода ПЦР при детекции возбудителя чумы в костных останках млекопитающих [2].

Цель работы – определение длительности сохранения ДНК чумного микроба в костной ткани грызунов и его количественной динамики во времени под воздействием биотических (ДНК-азы посторонней микрофлоры) и абиотических (изменяющиеся влажность, температура, инсоляция) факторов.

Материалы и методы

В сентябре 2014 г. было произведено заражение десяти морских свинок музейным штаммом *Y. pestis* КА-68 (работа с лабораторными животными проводилась согласно рекомендациям Биоэтической комиссии Талдыкорганской противочумной станции). Данный штамм является типичным для Среднеазиатского пустынного очага чумы и содер-

жит гены *pla* и *caf*, расположенные на плаزمиде *pPst* и *pFra*. Заражение лабораторных животных проводили внутрибрюшинно путем введения 1 мл микробной взвеси концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к. в 1 мл.

После гибели подопытных животных их скелеты освобождали от мягких тканей, обеззараживали и исследовали в ПЦР с детекцией результатов методом гель-электрофореза по методике, изложенной в инструкциях к коммерческим тест-системам. Для выделения ДНК использовали набор реактивов для универсальной пробоподготовки «GenPak» (фирма ООО «Лаборатория Изоген», Москва).

Аmplификацию образцов проводили с помощью трех наборов: набор реагентов для обнаружения ДНК *Y. pestis* гена *pla* (расположенного на плазмиде *pPst*) «GenPak» (фирма ООО «Лаборатория Изоген», Москва, РФ); набор реагентов «Pest-Quest», предназначенный для выделения ДНК возбудителя *Y. pestis* и содержащий праймеры для выявления генов *YPO-2088* и *cafI* (ТОО «master-gene», Алматы, РК); ПЦР-тест-система «ГенПест», содержащая две пары праймеров *PlaY1–PlaY2*, соответствует нуклеотидной последовательности гена *pla* (плаزمиде *pPst*) и *F21–F22*, комплементарна участку гена *caf* (плазмиде *pFra*) (РосНИПЧИ «Микроб», РФ).

Наибольшие разведения, при которых происходила детекция ДНК возбудителя чумы, наблюдали при использовании ПЦР-тест-системы «ГенПест». Визуализацию результатов ПЦР производили под УФ в 1,5 % агарозном геле с бромистым этидием.

Первоначально исследовали концентрированный материал. Далее, при получении положительного результата, материал подвергали последовательному десятикратному разведению для уточнения концентрации хромосомных и плазмидных генов. После этого кости морских свинок были заложены в железный ящик с крышкой (крышка с отверстиями размером 1×1 см). Опечатанный ящик был выставлен на огороженный участок охраняемой территории эпидотряда, круглогодично подвергаясь, таким образом, воздействию различных природно-климатических факторов.

Исследование костных останков морских свинок на наличие в них фрагментов ДНК чумного микроба проводили непосредственно после гибели животных, а затем дважды в год.

Результаты и обсуждение

Установлено, что при гибели грызунов от чумы в их костной ткани возможно обнаружение ДНК возбудителя как в высоких концентрациях, так и в низких [1]. Однако высокие титры (1:200000) регистрируются лишь у малой части особей. По нашим данным, только у 10 % зараженных животных наблюдаются довольно высокие показатели накопления плазмидных генов *Y. pestis* в костях. У части млекопитающих (20 %) титры накопления в костной ткани *Y. pestis* можно считать средними (1:20000). У большинства же животных в костях, по нашим на-

блюдениям, накапливается относительно низкое количество микробных клеток, выявляемых лишь в разведении 1:400, или такая концентрация, которая не обнаруживается ни одним из этих методов.

Учитывая вышесказанное, костные останки павших от чумной инфекции млекопитающих мы условно разделили на три группы: с высоким, средним и низким содержанием чумного микроба. Наблюдение за каждой группой костей проводилось отдельно друг от друга.

Через шесть месяцев в костной ткани животных снижения концентрации плазмидных генов не зафиксировано. Однако стоит отметить, что первые полгода наблюдений пришлось на осенне-зимний период, когда материал большую часть времени находился в относительно стабильных условиях при низкой температуре.

По прошествии одного года мы зафиксировали резкое снижение (в 100 раз) наблюдаемых разведений материала, при которых еще возможно обнаружение детектируемых плазмид. Полтора года наблюдений показало, что в костных останках млекопитающих, плазмидных генов чумного микроба обнаружить уже не удастся.

Ниже для сравнения представлены данные по динамике снижения капсульного антигена (FI) в костях больших песчанок (таблица) [1].

Таким образом, в связи с тем, что полноценный антиген и ДНК *Y. pestis* в костях грызунов сохраняются в течение 1–1,5 лет, а в костях умерших от чумы грызунов изначально накапливается (в связи с различной индивидуальной чувствительностью, разным количеством возбудителя) данный вид полевого материала теряет свою информативность в плане невозможной его датировки. Чтобы избавиться от этого дефекта и иметь возможность использовать перспективный метод характеристики энзоотического процесса, необходимо заново воссоздать систему смотровых площадок по сбору погадок и костей, которая действовала на Талдыкорганской противочумной станции в 1989–1995 гг.

Техника закладки таких «датированных» площадок довольно проста. Для них выбирают уже существующие приседы хищных птиц (геодезические пункты, одиночно стоящие деревья, столбы электропередач и т.д.), или готовятся искусственные туры на верушке барханов, где хищники до этого вынуждены были садиться на песок. Далее, эти площадки проверяют два раза в год или чаще. С площадок собирают кости млекопитающих и погадки пернатых, получая тем самым строго датированный материал.

При использовании данного подхода контур

Снижение среднегеометрических титров содержания капсульного антигена чумного микроба в костных останках млекопитающих

Реакция	Время наблюдения					
	После гибели песчанок	6 месяцев	1 год	1,5 года	5 лет	6–26 лет
РНГА	1:21450	1:115	1:25	0	0	0
РНАт	1:27020	1:3716	1:2941	1:2032	1:1016	1:83

пунктов и частота положительных результатов почти полностью совпадали с эпизоотическим контуром, полученном при бактериологическом исследовании носителей и переносчиков и при поиске песчанок с антителами.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новиков Г.С. Поиск антигена фракции I как метод эпизоотологического надзора за чумой на очаговых и потенциально очаговых территориях. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане.* 2001; 3:323–5.
2. Сутягин В.В., Кислицын Ю.В., Лездиньш И.А., Когай О.В., Ким И.Б., Бердибеков А.Т., Сапожников В.И., Копбаев Е.Ш., Шагайбаева Г.Ж., Наурузбаев М.О. О применении полимеразной цепной реакции для детекции чумного микроба в костных останках млекопитающих. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане.* 2014; 2:70–7.
3. Челомина Г.Н. Древняя ДНК. *Генетика.* 2006; 42(3):293–309.
4. Drancourt M., Aboudharam G., Signoli M., Dutour O., Raoult D. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1998; 95:12637–40.
5. Drancourt M., Signoli M., Dang L.V., Bizot B., Roux V., Tzortzis S., Raoult D. *Yersinia pestis* *orientalis* in remains of ancient plague patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(2):332–3.
6. Harbeck M., Seifert L., Hansch S., Wagner D.M., Birdsell D., Parise K.L., Wiechmann I., Grupe G., Thomas A., Keim P., Zoller L., Bramanti B., Riehm J.M., Scholz H.S. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6th century AD reveals insights into Justinianic Plague. *Plos. Patog.* 2013; 9(5):e1003349. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003349.
7. Tran N.N., Signoli M., Fozzati L., Aboudharam G., Raoult D., Drancourt M. High throughput, multiplexed pathogen detection authenticates plague waves in Medieval Venice, Italy. *PLoS ONE.* 2011. 6(3):e16735. DOI: 10.1371/journal.pone.0016735.

References

1. Novikov G.S. [Search of antigen fraction I as a method of epizootiological surveillance over plague in focal and potentially focal territories]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane.* 2001; 3:323–5.
2. Sutyagin V.V., Kislytsyn Yu.V., Lezdin'sh I.A., Kogay O.V., Kim I.B., Berdibekov A.T., Sapozhnikov V.I., Kopbaev E.Sh., Shagaibaeva G.Zh., Nauruzbaev M.O. [Concerning application of polymerase chain reaction for the detection of plague microbe in bone remains of mammals]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane.* 2014; 2:70–7.
3. Chelomina G.N. [Ancient DNA]. *Genetika.* 2006; 42(3):293–309.
4. Drancourt M., Aboudharam G., Signoli M., Dutour O., Raoult D. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1998; 95:12637–40.
5. Drancourt M., Signoli M., Dang L.V., Bizot B., Roux V., Tzortzis S., Raoult D. *Yersinia pestis* *orientalis* in remains of ancient plague patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(2):332–3.
6. Harbeck M., Seifert L., Hansch S., Wagner D.M., Birdsell D., Parise K.L., Wiechmann I., Grupe G., Thomas A., Keim P., Zoller L., Bramanti B., Riehm J.M., Scholz H.S. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6th century AD reveals insights into Justinianic Plague. *Plos. Patog.* 2013; 9(5):e1003349. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003349.
7. Tran N.N., Signoli M., Fozzati L., Aboudharam G., Raoult D., Drancourt M. High throughput, multiplexed pathogen detection authenticates plague waves in Medieval Venice, Italy. *PLoS ONE.* 2011. 6(3):e16735. DOI: 10.1371/journal.pone.0016735.

Authors:

Sutyagin V.V., Kogay O.V., Berdibekov A.T. Taldykorgan Plague Control Station. 104, Tauelsizdik St., Taldykorgan, 004000, Republic of Kazakhstan. E-mail: tpstald@mail.ru.
 Mekka-Mechenko T.V. M. Aykimbaev Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Infections. 14, Kapalskaya St., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan. E-mail: tmeka-mechenko@kscqzkd.kz.

Об авторах:

Сутягин В.В., Когай О.В., Бердибеков А.Т. Талдыкорганская противочумная станция. Республика Казахстан, 004000, г. Талдыкорган, ул. Тауелсиздик, д. 104. E-mail: tpstald@mail.ru.
 Мекка-Меченко Т.В. Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М.Айкимбаева. Республика Казахстан, 050054, г. Алматы, ул. Капальская, 14. E-mail: tmeka-mechenko@kscqzkd.kz.

Поступила 22.09.16.