



БИОЛОГИЯ

УДК 616.98:579.842.23

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ОСНОВНОГО ПОДВИДА СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЁТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ И SNP ТИПИРОВАНИЯ

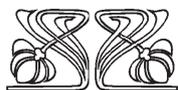
А. Н. Балыкова, Н. Ю. Носов, К. А. Никифоров, Г. А. Ерошенко

Балыкова Алина Николаевна, студент кафедры биохимии и биофизики биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, alinabalnik@gmail.com

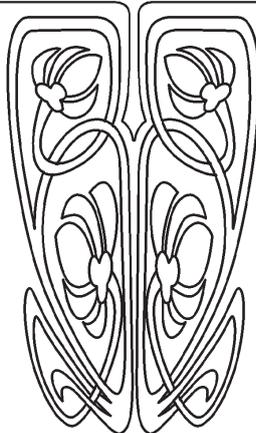
Носов Никита Юрьевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, posovnj@mail.ru

Никифоров Константин Алексеевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, nikiforov666666@mail.ru

Ерошенко Галина Александровна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, geroshenko@yandex.ru



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



Разработаны способы дифференциации и идентификации штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени и методом SNP типирования. В работе использован 91 штамм *Y. pestis* средневекового биовара из очагов России и других стран СНГ, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Штаммы средневекового биовара представлены четырьмя уже известными филогенетическими линиями: 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3. В результате проведения филогенетического анализа нами обнаружена новая филогенетическая линия, получившая название 2.MED4. Найден 3 SNPs, маркерные для данной линии и расположенные в белок-кодирующих областях генома, с помощью которых можно установить принадлежность штаммов средневекового биовара *Y. pestis* к ветви 2.MED4. Для проведения идентификации и дифференциации штаммов средневекового биовара методом мультиплексной ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов выбраны 4 ДНК мишени: Med24, pCKF, 2.MED1, 2.MED3. В ходе исследования показана 100% специфичность данных мишеней. Комплексное использование разработанных способов ПЦР-РВ и SNP типирования обеспечивает успешную дифференциацию штаммов средневекового биовара по филогенетической принадлежности.

Ключевые слова: возбудитель чумы, дифференциация штаммов, ПЦР-РВ, филогенетический анализ.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-306-311

Введение

Чума – природно-очаговая особо опасная инфекционная болезнь, этиологическим агентом которой является грамотрицательная бактерия *Yersinia pestis*. Чума до сих пор представляет серьёзную опасность



для общества, проявляя себя в виде вспышек и отдельных случаев заболевания [1–7].

Штаммы возбудителя чумы делятся на основную и неосновные подвиды. Высоковирулентными и эпидемически значимыми являются штаммы основного подвида [1–6]. Среди представителей основного подвида наиболее эволюционно молодой является ветвь средневекового биовара. Штаммы именно этого биовара послужили причиной крупных вспышек чумы в Поволжье в конце XVIII – начале XX в.

Представители средневекового биовара широко распространены на территории Евразии и не встречаются на других континентах. Они циркулируют в 32 из 45 природных очагов стран СНГ, в том числе в 7 из 11 очагов Российской Федерации. Штаммы этого биовара также встречаются на территории Китая, Ирана, Индии и Монголии [3, 4].

В связи с широкой распространенностью и высокой вирулентностью штаммов средневекового биовара актуальной является разработка современных способов молекулярной идентификации штаммов данного биовара, что необходимо для повышения эффективности эпидемиологического мониторинга очагов России и других стран СНГ.

Цель работы – разработка способов дифференциации штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара методом ПЦР с гибридно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и методом SNP типирования.

Материалы и методы

Исследование проводилось в лаборатории молекулярной микробиологии ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Был использован 91 штамм *Y. pestis* из Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб». Фрагментное секвенирование проводили на генетическом анализаторе «Applied Biosystems 3500XL». Анализ полученных последовательностей выполняли при помощи программ Mega 7.0 и алгоритма BLAST. Полногеномное секвенирование геномов штаммов выполняли в системе Ion PGM (Life Technologies, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для проведения филогенетического анализа и установления популяционной структуры *Y. pestis* на основании полногеномного SNP анализа применяли эффективный биоинформационный алгоритм (Wombac 2.0, RAUP 4.0, MEGA 7.0, FigTree 1.4.3) [4]. Поиск indel-мишеней и SNP осуществляли в программах Mauve 2.4.0 и MEGA 7.0 соответственно. Для разработки способа дифференциации штаммов средневекового биовара использовали метод ПЦР с гибридно-

флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием мишеней Med24, 2.MED0, 2.MED1 и 2.MED3 [2–4]. Реакция ПЦР-РВ на мишень Med24 проводилась отдельно, другие мишени амплифицировались мультиплексно. Условия реакции для проведения ПЦР были следующими: 1 цикл 95°C 15 мин; 5 циклов 95°C 20 с, 60°C 20 с, 72°C 20 с; 30 циклов: 95°C 15 с, 58°C 45 с, 72°C 20 с.

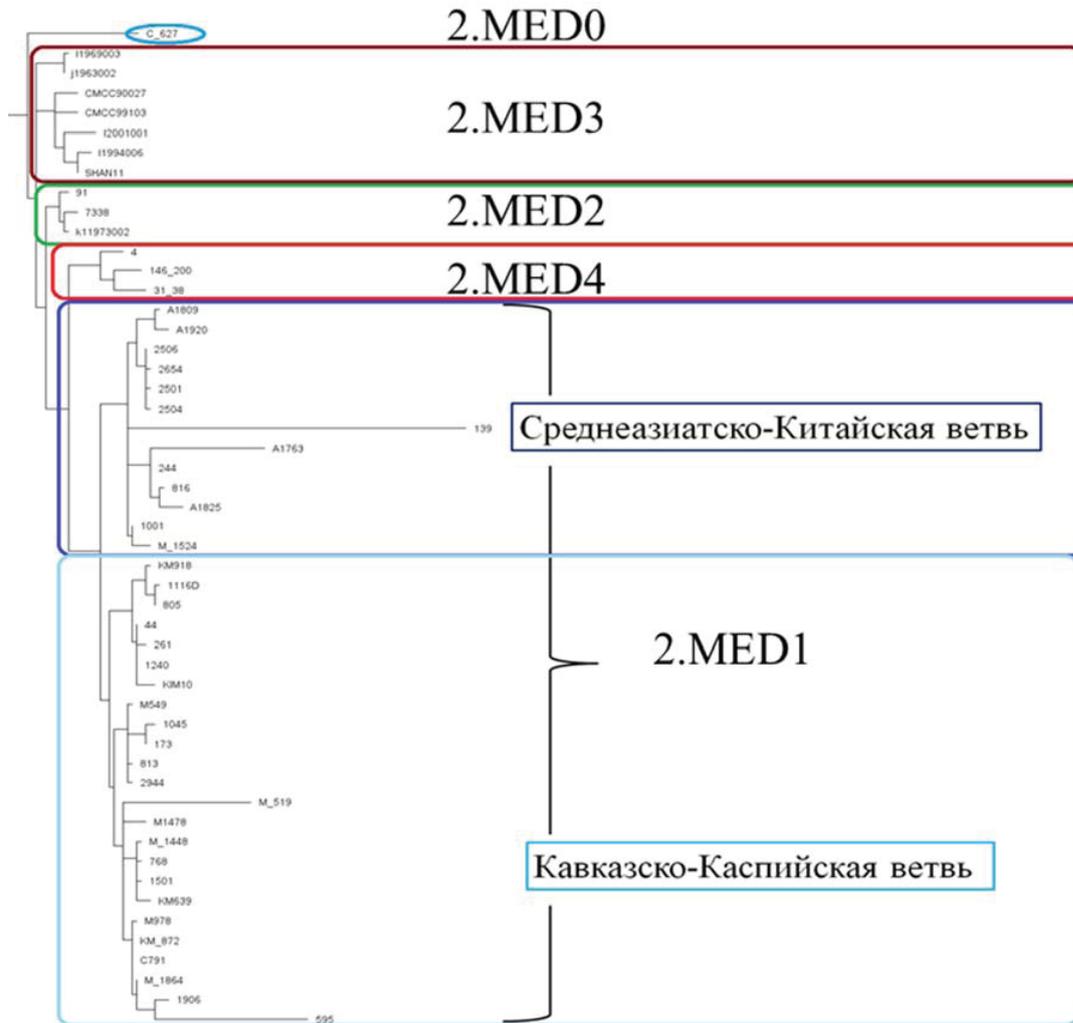
Результаты и их обсуждение

Для проведения филогенетического анализа и определения популяционной структуры средневекового биовара выполняли полногеномный SNP анализ геномов штаммов из природных очагов РФ и сопредельных государств. Филогенетический анализ проводили с помощью метода *Maximum Likelihood* с моделью замены НКУ85 при помощи программы PhyML 3.1. В результате анализа была выявлена 1791 единичная нуклеотидная замена в коровом геноме использованных штаммов.

Как следует из дендрограммы (рисунок) штаммы средневекового биовара (2.MED) включают четыре основные филогенетические линии: 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3 [3, 4].

В основании ветви 2.MED расположен штамм С-627, относящийся к ветви 2.MED0. Штаммы данной линии отличаются от других средневековых штаммов: для своего роста нуждаются в аминокислоте пролине, обладают уникальной плазмидой rCKF и встречаются только в Центрально-Кавказском высокогорном очаге в России [2–4]. Далее от общего ствола эволюции последовательно ответвляются линии 2.MED3 и 2.MED2, штаммы которых циркулируют в некоторых провинциях Китая, граничащих со странами СНГ. Самой разнообразной филогенетической линией средневекового биовара является 2.MED1. Штаммы данной линии широко распространены на территории России, других стран СНГ, а также – в Туркмении, Грузии и других сопредельных государствах. Линия 2.MED1, как следует из дендрограммы (см. рисунок), в свою очередь, делится на два ветви: Среднеазиатско-Китайскую и Кавказско-Каспийскую в соответствии с филогеографическим принципом, что совпадает с ранее полученными результатами [3, 4].

При анализе дендрограммы впервые выявлена еще одна отдельная эволюционная линия, ранее не представленная в филогении средневекового биовара. Мы обозначили ее как 2.MED4. Эту ветвь составили три штамма (4, 146_200, 31_38), выделенные в разное время в очагах Кавказа и Прикаспия: Зангезуро-Карабахском и Волго-Уральском песчаном.



Филогенетический анализ и популяционная структура средневекового биовара (2.MED) по данным полно-геномного SNP анализа 117 штаммов *Y. pestis* из природных очагов РФ и сопредельных государств (метод *Maximum Likelihood* с моделью замены НКУ при помощи программы PhyML 3.1)

Для выявления штаммов средневекового биовара, которые относятся к новой филогенетической линии 2.MED4, нами был проведен поиск специфических для этой линии генетических маркеров – indel-мутаций и SNPs при помощи программ Mauve 2.4.0 и Mega 7.0.

На первом этапе проводили сравнительный анализ геномов в программе Mauve 2.4.0. По результатам данного анализа у представителей

линии 2.MED4 indel-мутаций обнаружено не было. Следующим этапом был поиск уникальных SNP's в программе Mega 7.0 при помощи функции *Phylogenetic analysis*. Нами были выбраны 3 SNPs, расположенные в белок-кодирующих областях (табл. 1). На данные мишени были рассчитаны праймеры с помощью программы Vector NTI 10 (табл. 2). Праймеры были синтезированы в РосНИПЧИ «Микроб».

Таблица 1

Выбранные маркерные SNP мишени на линию 2.MED4

Позиция маркерного SNP по геному референтного штамма <i>Y. pestis</i> CO92	Замена нуклеотида	Локус, кодируемый продукт
117694	A → G	<i>priA</i> – праймосома-связывающий белок
522489	C → A	<i>apaH</i> – диаденозин тетрафосфат
3869329	G → A	<i>phnL</i> – фосфонаты, транспортирующие АТФ-связывающий белок



Таблица 2

Олигонуклеотидные праймеры на SNP линии 2.MED4

Праймеры	Последовательности праймеров 5' → 3'
<i>apaH-S</i> <i>apaH-As</i>	GGGACCACGGGCAACTAAA TGGCTGCCTCGATGAAT
<i>phnL-S</i> <i>phnL-As</i>	ACGCTGCTACGCTCCCTCTA TGACTGACCCAACCGACA
<i>priA-S</i> <i>priA-As</i>	TCAGCCGTTGCAGCAGTT GGCGTTATGGATTATGGG

С их использованием методом ПЦР получали ампликоны, содержащие переменные нуклеотиды. Амплифицированные ПЦР фрагменты секвенировали и по наличию маркерных нуклеотидов устанавливали принадлежность штаммов к ветви 2.MED4.

С помощью рассчитанных праймеров (см. табл. 2) на принадлежность к ветви 2.MED4 было проверено 12 штаммов *Y. pestis*, близких по региону и времени выделения к штаммам этой ветви. В результате удалось выявить еще два штамма (102(147) и 27(33)), относящиеся к Волго-Уральскому степному и Прикаспийскому Северо-Западному степному очагам соответственно, которые содержали все три SNPs, маркерных для 2.MED4.

Поскольку методы секвенирования требуют наличия дорогостоящего оборудования актуальным является поиск быстрых и эффективных методов идентификации и дифференциации

штаммов *Y. pestis* с помощью более доступных методов молекулярно-генетического анализа. В последнее время широкое распространение в лабораторной диагностике возбудителей инфекционных болезней получил метод ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени.

Для разработки метода идентификации и дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара методом ПЦР-РВ с гибридационно-флуоресцентным учётом результатов были выбраны следующие ранее найденные ДНК мишени: Med24, 2.Med0, 2.Med1 и 2.Med3 [2–4]. Ранее эти ДНК мишени были использованы в основном для разделения штаммов методом ПЦР с электрофоретическим учётом результатов.

В рамках данной работы эти ДНК мишени использовались для проведения ПЦР-РВ. На них были рассчитаны праймеры и зонды в формате TaqMan (табл. 3).

Таблица 3

Олигонуклеотидные праймеры и зонды для дифференциации штаммов методом ПЦР-РВ

Праймер	Последовательность праймера, зонда
2.Med1-S	AGCGGCACTCTCTACGAAAT
2.Med1-As	TGACTCCATTGAAGACGCTATTG
2.Med3-S	CCGTTGTACGATGGTGCTTT
2.Med3-As	CCGTGAGGTCTGTGGTGTAT
Med(24)-(RealTime)-S	GCCAGTGTGTGTCTAAAG
Med(24)-(RealTime)-As	CGCAACATTCGTCGCAAA
pCKF(RealTime)-S	aaccgcctaagcactttat
pCKF(RealTime)-As	cgtcaggaactcaacgaa
TaqMan зонд	Последовательность зонда
2.Med1-Zond	FAM-TCACCCATCGGTAAGCAGCAGCATACGA-RTQ1
2.Med3-Zond	Cy5-TGAGCCAGTGCGCCACCACT-BHQ2
Med(24)-Zond	R6G -ACATTGTGCTGGACTCACAGCCCC- RTQ1
pCKF(RealTime)-Zond	ROX -atcagagacatttgagcggttg- BHQ2



Способ дифференциации штаммов средневекового биовара по принадлежности к филогенетическим линиям осуществляется в две реакции ПЦР-РВ: реакцию с мишенью Med24 проводят в отдельной пробирке. С мишенями 2.Med1, 2.Med3 и рСКФ проводят мультиплексную ПЦР-РВ в одной пробирке.

Принадлежность исследуемого штамма к средневековому биовару устанавливают по отсутствию сигнала флуоресценции по жёлтому каналу R6G, по которому детектируется мишень Med24. По наличию сигнала флуоресценции по оранжевому каналу ROX, по которому происходит определение мишени рСКФ, устанавливают принадлежность штаммов к линии 2.MED0. Отсутствие сигнала флуоресценции по зелёному каналу FAM по мишени 2.Med1 означает, что штамм принадлежит к линии 2.MED1. Отрицательный сигнал флуоресценции по красному каналу Cy5 по мишени 2.Med3 характерен для штаммов линии 2.MED3. Штаммы линии 2.MED2 дают сигнал флуоресценции по мишени 2.Med1 и по 2.Med3. По совокупности результатов по всем четырём ДНК-мишеням определяют принадлежность штаммов *Y. pestis* к средневековому биовару и его филогенетическим линиям (табл. 4).

В ходе исследования 91 штамма средневекового биовара показана 100% специфичность разработанного способа дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара.

Таблица 4

Сводная таблица определения принадлежности исследуемого штамма *Y. pestis* к средневековому биовару и филогенетическим линиям

Филогенетическая линия	ДНК мишень			
	Med24	2.Med1	2.Med3	рСКФ
2.MED0	+	+	+	+
2.MED1	–	–	+	–
2.MED2	–	+	+	–
2.MED3	–	+	–	–

Заключение

Нами проведён анализ современной популяционной структуры штаммов средневекового биовара *Y. pestis* методом полногеномного SNP анализа и обнаружена новая филогенетическая линия 2.MED4. На данную линию найдены уникальные SNPs, с помощью которых можно проводить определение принадлежности штаммов средневекового биовара к линии 2.MED4. Также разработан способ идентификации и

дифференциации штаммов различных филогенетических линий средневекового биовара 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2 и 2.MED3 методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени. Комплексное использование разработанных способов ПЦР-РВ и SNP типирования обеспечивает дифференциацию штаммов средневекового биовара по филогеографической принадлежности.

Список литературы

1. Попова А. Ю., Кутырев В. В., Балахонов С. В., Ежлова Е. Б., Демина Ю. В. Координация мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в 2016 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. Вып. 4. С. 5–10.
2. Оглодин Е. Г., Одинокоев Г. Н., Никифоров К. А., Куклева Л. М., Ерошенко Г. А. Определение геновариантов штаммов *Yersinia pestis* основного подвида методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов // Проблемы особо опасных инфекций. 2014. Вып. 4. С. 52–55.
3. Одинокоев Г. Н. Генетический анализ биохимических особенностей штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов : автореф. ... дис. канд. биол. наук. Саратов. 2010. 22 с.
4. Носов Н. Ю. Филогенетический анализ и дифференциация штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара : автореф. ... дис. канд. биол. наук. Саратов, 2017. 22 с.
5. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Dieh II., Kusecek B., Vogler A. J., Wagner D. M., Allender C. J. W., Easterday R., Chenal-Francois V., Worsham P., Thomson N. R., Parkhill J., Lindler L. E., Carnie E., Keim P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. № 101. P. 17837–17842.
6. Morelli G., Song Y., Mazzoni C. J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D. M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A. J., Li Y., Cui Y., Thomson N. R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J. M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity // Nature Genetics. 2010. Vol. 42. P. 1140–1143.
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 variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis* // PNAS. 2013. Vol. 110. № 2. P. 577–582.



Differentiation of *Yersinia pestis* Strains of the Main Subspecies of Medieval Biovar by Real-Time PCR Method with Hybridization-Fluorescence Registration and SNP Typing

**A. N. Balykova, N. Yu. Nosov,
K. A. Nikiforov, G. A. Eroshenko**

Alina N. Balykova, ORCID 0000-0003-3766-7979, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, alinabalnik@gmail.com

Nikita Yu. Nosov, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, nosovnj@mail.ru

Konstantin A. Nikiforov, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, nikiforov666666@mail.ru

Galina A. Eroshenko, ORCID 0000-0001-5403-989X, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, geroshenko@yandex.ru

Methods of differentiation and identification of *Yersinia pestis* strains of medieval biovar by real-time PCR method with hybridization-fluorescent results' registration and SNP typing method have been developed. Ninety-one *Y. pestis* strains of medieval biovar from the plague foci of Russia and other CIS countries, received from the State Collection of Pathogenic Bacteria at the Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», were used in this work. The strains of medieval biovar are represented by four already known phylogenetic lines: 2.MED0, 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3. As a result of phylogenetic analysis we have discovered a new phylogenetic line, named 2.MED4. We have found 3 SNPs, which are marker for this line and located in protein-coding regions of the genome, which can be used to establish the belonging of *Y. pestis* strains of the medieval biovar to the line 2.MED4. To identify and differentiate strains of the medieval biovar by the multiplex real-time PCR method with hybridization-fluorescent results' registration, 4 DNA-targets: Med24, pCKF, 2.MED1, 2.MED3 have been selected. 100% specificity of these targets is shown. The use of a complex of the developed methods of real-time PCR and SNP typing provides a successful differentiation of strains of the medieval biovar by phylogeographic affiliation.

Key words: plague agent, differentiation of strains, real-time PCR, phylogenetic analysis.

Образец для цитирования:

Балыкова А. Н., Носов Н. Ю., Никифоров К. А., Ерошенко Г. А. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного подвида средневекового биовара методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени и SNP типирования // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 306–311. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-306-311

Cite this article as:

Balykova A. N., Nosov N. Yu., Nikiforov K. A., Eroshenko G. A. Differentiation of *Yersinia pestis* Strains of the Main Subspecies of Medieval Biovar by Real-Time PCR Method with Hybridization-Fluorescence Registration and SNP Typing. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 306–311 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-306-311