

УДК 6161.98:579.842.23

Конструирование системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы

© 2020 К.А. НИКИФОРОВ^{1,*}, Д.В. УТКИН¹, М.А. МАКАШОВА¹, Л.М. КУКЛЕВА¹, Г.А. ЕРОШЕНКО¹, В.В. КУТЫРЕВ¹

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Саратов 410005

*e-mail: Nikiforov666666@mail.ru, rusrapi@microbe.ru

Поступила в редакцию 22.01.2020 г.

После доработки 12.03.2020 г.

Принята к публикации 21.05.2020 г.

Штаммы возбудителя чумы различаются по внутривидовой принадлежности, региону происхождения, а также по вирулентности. Актуальной задачей является разработка быстрого и надежного способа индикации штаммов *Y. pestis*, их идентификации по внутривидовой принадлежности и оценке вирулентности. Для решения этой задачи нами сконструирована система мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а также по наличию основных генов факторов патогенности хромосомной и плазмидной локализации. Эффективность метода подтверждена на 114 штаммах чумы разного происхождения. Разработанная система мультиплексных ПЦР на твердой подложке с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов может быть использована для молекулярно-генетической идентификации штаммов из природных очагов чумы с определением их принадлежности к основным филогенетическим ветвям и оценки вирулентности, для повышения санитарно-эпидемиологического контроля территории РФ и стран СНГ.

Ключевые слова: возбудитель чумы, штаммы, индикация и идентификация, ПЦР.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-46-56

Yersinia pestis – возбудитель особо опасной инфекционной болезни – чумы, способной вызывать чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения [1, 2]. Природные очаги расположены на всех континентах, за исключением Австралии и Антарктиды в разных географических ландшафтах [3, 4]. Это обилие природных биоценозов послужило причиной внутривидового разнообразия штаммов *Y. pestis* и отличий в их свойствах и вирулентности. На основании данных полногеномного секвенирования и молекулярно-генетического анализа установлена современная популяционная структура штаммов *Y. pestis*. Проведено усовершенствование внутривидовой классификации возбудителя чумы с выделени-

ем семи подвигов: основной, тибетский (0.PE7), кавказский (0.PE2), ангольский (0.PE3), центральноазиатский (0.PE4), цинхайский (0.PE10), улегейский (0.PE5). В центральноазиатский подвид включено четыре биовара – алтайский (0.PE4a), гиссарский (0.PE4h), таласский (0.PE4t), microtus (0.PE4m) [5, 6].

Штаммы основного подвида делятся на три биовара – античный, средневековый и восточный. Штаммы античного биовара включают несколько филогенетических линий: 0.ANT – 4.ANT [7–11]. В настоящее время штаммы 0.ANT сохранились в высокогорных очагах Тянь-Шаня [12]. Дальнейшая эволюция линии 1.ANT привела к возникновению восточного биовара (1.ORI), получившему

Список сокращений: п.н. – пары нуклеотидов, ПЦР – полимеразная цепная реакция ИФА – иммуноферментный анализ, ДНТФ – дезоксинуклеозидтрифосфат

широкое распространение на всех континентах во время третьей пандемии чумы. Штаммы линии 2.ANT являются предшественниками штаммов средневекового биовара (2.MED), который также состоит из нескольких филогенетических линий. На территории Российской Федерации распространены штаммы линий 2.MED0 (Центрально-Кавказский высокогорный очаг чумы) и 2.MED1 (большинство очагов РФ и других стран СНГ).

Штаммы неосновных подвидов встречаются в отдельных географических регионах: кавказского – в очагах Кавказа и Закавказья; центральноазиатского – в Горном Алтае и Монголии (алтайский биовар), в Таджикистане (гиссарский биовар), в Республике Кыргызстан (таласский биовар) и в двух очагах чумы в Китае (биовар *microtus*); улегейского – в Монголии. На территории Российской Федерации, стран СНГ и сопредельных государств распространены штаммы основного, кавказского, центральноазиатского и улегейского подвидов. Штаммы еще двух неосновных подвидов – тибетского и цинхайского циркулируют в отдельных регионах Китая, а единственный известный штамм ангольского подвида был выделен в Африке [6].

Вирулентность *Y. pestis* является полидетерминантным признаком и зависит от наличия факторов патогенности, кодируемых генами хромосомной и плазмидной локализации. В геном *Y. pestis* включена хромосомная область пигментации, содержащая остров высокой патогенности HPI с генами сидерофор-зависимой системы потребления железа. При утрате острова высокой патогенности HPI штаммы *Y. pestis* становятся авирулентными [13].

Гены факторов патогенности возбудителя чумы расположены также на трех резидентных плаزمидах: родоспецифической *pCad* и двух видоспецифических *pFra* и *pPst* [14–15]. Плаزمид *pCad* включает гены, кодирующие систему секреции третьего типа (ССЗТ), являющуюся обязательным фактором вирулентности чумного микроба [17–19]. Одним из основных компонентов ССЗТ является белок *LcrV*, продукт гена *lcrV*, который участвует в секреции эффекторных белков *Y. pestis* в клетки млекопитающих. Плаزمид *pFra* содержит ген *cafI*, кодирующий капсульный белок фракции F1 – фактор патогенности и иммуногенности. Плаزمид *pPst* несет в своем составе ген *pla* активатора плазминогена, продукция которого необходима для развития бубонной и легочной форм болезни. Вышеуказанный плазмидный профиль характерен для всех штаммов возбудителя чумы, за исключением штаммов кавказского подвида, у которых отсутствует плаزمид *pPst*.

Штаммы *Y. pestis* основного и неосновных подвидов отличаются по вирулентности. Штаммы основного подвида высоковирулентны и эпидемически значимы. Для штаммов неосновных подвидов характерна избирательная вирулентность и низкая эпидемическая значимость [20].

В целом штаммы *Y. pestis* разных подвидов близки по свойствам. Их дифференциация по внутривидовой принадлежности и региону происхождения является непростой задачей. В то же время ввиду высоких поражающих свойств штаммов *Y. pestis*, способности к эпидемическому и пандемическому распространению и возможностью использования в актах биотерроризма, требующих принятия быстрых решений, важной задачей является получение наиболее полных сведений о штаммах возбудителя в максимально короткие сроки и с высокой степенью надежности. Это требует совершенствования лабораторной диагностики чумы с использованием современных молекулярно-генетических технологий. Актуальной является разработка способа индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а также по наличию генов основных факторов вирулентности.

К одним из наиболее эффективных, многофакторных и быстрых методов молекулярной диагностики относятся системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке, которые позволяют детектировать большое количество маркеров (от нескольких десятков до нескольких сотен и тысяч). Достигается это путем иммобилизации специфических ДНК-зондов на твердой подложке, проведения одновременного анализа многих образцов и получения результата по нескольким показателям.

Примерами применения этой технологии может служить использование ПЦР на твердой подложке с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в системе для одновременной детекции ДНК возбудителей чумы, туляремии, сибирской язвы, а также для параллельной детекции и идентификации возбудителей чумы и сибирской язвы в пищевых продуктах [21, 22]. Известно 4 зарубежных коммерческих системы ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке, созданных для детекции возбудителей инфекционных болезней: *B. anthracis* (Affymetrix, США), *Brucella melitensis* (University of Namur, США), *V. cholerae O1* (Nimblegen, США) и *E. coli O:157* (Agilent Technologies, США).

В Российской Федерации сконструированы опытно-промышленные системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным

учетом результатов на твердой подложке для детекции возбудителей особо опасных инфекций, в том числе, возбудителей сибирской язвы, чумы, туляремии, бруцеллеза [23]. Однако, разработанные системы осуществляют лишь детекцию возбудителя чумы и не позволяют проводить внутривидовую идентификацию штаммов *Y. pestis* и проводить оценку их вирулентности.

Цель настоящего исследования состояла в конструировании системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для индикации *Y. pestis* и идентификации штаммов возбудителя по их принадлежности к определенным подвидам, биоварам, филогенетическим линиям и для определения наличия у них основных факторов патогенности.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы и среды

В работе использовано 114 штаммов *Y. pestis* разных подвигов, биоваров, филогенетических линий: линии 0.ANT – 10 штаммов, линии 1.ANT – 10 штаммов, линии 2.ANT – 10 штаммов, линии 2.MED1 – 15 штаммов, линии 2.MED0 – 6 штаммов, восточного биовара 1.ORI – 10 штаммов, алтайского биовара – 15 штаммов, гиссарского биовара – 8 штаммов, улегейского подвида – 8 штаммов, кавказского подвида – 10 штаммов, биовара *microtus* – 6 штаммов, таласского биовара – 6 штаммов. Все штаммы были получены из Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб». Культивирование штаммов проводили в бульоне и на агаре LB (рН 7,2) при 28 °С в течение 24–48 ч. Анализ биохимических свойств штаммов выполняли в соответствии с принятыми методами лабораторной диагностики возбудителя чумы [24].

Поиск ДНК мишеней, конструирование праймеров, проведение ПЦР

Поиск ДНК мишеней проводили с применением программы Mega 6.0 (<http://www.megasoftware.net/>). Оценка специфичности найденных мишеней выполняли с помощью алгоритма BLAST по базе данных полногеномных последовательностей штаммов *Y. pestis* NCBI GenBank. Расчет праймеров проводили с помощью программы Vector NTI 10 (<http://www.thermofisher.com>). Зонды содержали аминокислотную группу на 5'-конце для их иммобилизации на стекле (слайде). Обратный праймер включал флуоресцентный краситель – Cy5. ПЦР проводили в амплификаторе БИС в виде шести мультиплексных смесей (Кольцо-

во, Россия). Для проведения ПЦР применяли Hot Start Taq ДНК полимеразу и смесь ДНТФ компании SibEnzyme (Россия), условия реакции были следующие: 1 цикл – 95 °С 10 мин; 40 циклов – 95 °С 25 с, 59 °С 35 с, 72 °С 30 с; завершающий цикл – 72 °С 3 мин.

Нанесение зондов на подложку

Основные этапы анализа образцов штаммов *Y. pestis* в системе мультиплексных ПЦР на твердой подложке с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов проводили согласно методикам, описанным ранее [21, 25, 26]. Зонды на слайд наносили с применением буфера для печати, который в 100 мкл содержал 75 мкл 5М раствора бетаина, 25 мкл PBS буфера, 0,2 мкл 10% раствора твина-20. Буфером для печати разводили олигонуклеотидные зонды до концентрации 50 пкмоль/мкл, затем с помощью миниплоттера Xact Microarrayer (LabNEXT, США) наносили на поверхность аминослайдов GAPS II Coated Slides (Corning, США) методом контактной печати в виде отдельных спотов по вертикали в двух повторях. Группа спотов формировала эррею, предназначенные для анализа конкретных образцов (рис. 1). Для иммобилизации нанесенных зондов слайды инкубировали 20 мин при температуре 60 °С и при комнатной температуре в течение 18 ч.

Подготовка образцов и гибридизация

Исследуемые штаммы выращивали до концентрации 10⁹ КОЕ/мл. Выделение ДНК выполняли с использованием коммерческих наборов PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США). Полученную ДНК использовали для проведения индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы.

Во избежание неспецифического связывания перед проведением гибридизации выполняли прегибридизацию – блокировку поверхности твердой подложки. Для этого на поверхность твердой подложки с иммобилизованными на ней зондами вносили по 100 мкл блокирующего буфера (SSPE-буфер 20х, раствор Дейнхардта 1х, ДНК спермы лосося – в конечной концентрации 0,2 мг/мл). Блокировку проводили на термошейкере при температуре 42 °С в течение 30 мин при скорости вращения платформы 250 об./мин. Слайды отмывали 0,1х раствором SSPE-буфера с добавлением 0,2% SDS при температуре 42 °С в течение 5 мин при скорости вращения платформы 250 об./мин.

Для проведения гибридизации в ячейки вносили 80 мкл предварительно прогретой при 95 °С в течение 5 мин смеси, состоящей из 10 мкл ПЦР-продукта и 70 мкл буфера следующего

состава: 20x SSPE-буфер, гибридационный коктейль с конечной концентрацией формамида 15%, раствор Дейнхардта 1x, ДНК спермы лосося – в конечной концентрации 0,2 мг/мл. В ячейку вносили ПЦР продукты всех шести мультиплексных ПЦР-смесей. В качестве трафаретов использовали 16-луночные гибридационные камеры 16-well incubation chamber (Whatman, Германия). Слайды с нанесенными трафаретами помещали в рамки-держатели FAST-Frame (Whatman). Гибридацию проводили на термошейкере при температуре 42 °С в течение 5 ч при скорости вращения платформы 250 об./мин. Затем содержимое из ячеек отбирали с помощью вакуумного медицинского аспиратора и отмывали слайды сначала 2x раствором SSPE-буфера при температуре 42 °С в течение 2 мин при скорости вращения платформы 250 об/мин, затем 0,1x раствором SSPE-буфера с добавлением 0,2% SDS. Далее камеры снимали, слайды вынимали из рамок, ополаскивали дистиллированной водой и высушивали. Стекла вы-

сушивали с помощью центрифугирования при 1000 об/мин в течение 1 мин и хранили при температуре 4 °С до их использования.

Учет и анализ результатов

Регистрацию и учет результатов анализа проводили с помощью сканера микрослайдов GenePix 4100A и прилагаемого программного обеспечения GenePix Pro 6.0.

Рассчитывали критический уровень сигнала флуоресценции по формуле:

$$C_{кр} = 2,2 K^{-},$$

где K^{-} – значение флуоресценции отрицательного контроля при 635 нм. Коэффициент 2,2 использован нами согласно стандартной методике учета результатов систем мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке и ИФА.

Результат считали отрицательным, если среднее значение флуоресценции при длине волны 635 нм для 4-х спотов одного зонда было меньше критического уровня флуоресценции. Результат считали положительным, если среднее значение флуоресценции при длине волны 635 нм для 4-х спотов одного зонда было больше или равно критическому уровню флуоресценции. Результаты анализа подлежали учету при отрицательном результате в лунке отрицательного контроля (гибридационный буфер).

Статистическая обработка данных

Результаты исследований обрабатывали статистически [27]. Для этого брали среднеарифметические показатели уровня флуоресценции спотов каждой мишени с расчетом доверительного интервала, сравнивая их с уровнем флуоресценции отрицательного контроля, после чего рассчитывали t-критерий Стьюдента для определения достоверности различий. Каждое измерение проводили в трех независимых экспериментах.

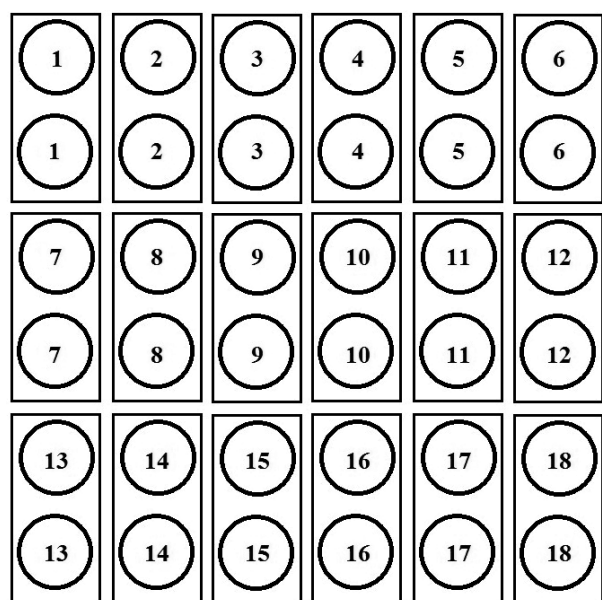


Рис. 1. Схема расположения ДНК-мишеней на эррях системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы: 1 – Micr, 2 – Tal, 3 – Caucas, 4 – Alt, 5 – Ul, 6 – His, 7 – 45, 8 – Med24, 9 – Med70, 10 – glpD, 11 – Pro, 12 – Phage, 13 – 3a, 14 – yihN, 15 – irp2, 16 – pla, 17 – lcrV, 18 – cafI.

Fig. 1. Diagram of DNA targets on the arrays of the multiplex PCR system with hybridization-fluorescent registration of results on solid substrate for indication and identification of plague agent strains: 1 – Micr, 2 – Tal, 3 – Caucas, 4 – Alt, 5 – Ul, 6 – His, 7 – 45, 8 – Med24, 9 – Med70, 10 – glpD, 11 – Pro, 12 – Phage, 13 – 3a, 14 – yihN, 15 – irp2, 16 – pla, 17 – lcrV, 18 – cafI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Поиск ДНК мишеней, конструирование зондов и праймеров, комплектация ПЦР смесей

Для разработки системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке с одновременным определением принадлежности исследуемых штаммов к виду *Y. pestis*, подвиду, биовару, филогенетической линии, а также определением генов основных факторов патогенности проведен поиск ДНК-мишеней, обеспечивающих такую индикацию и идентификацию. Для этих целей

были выбраны ДНК-мишени с рассчитанными на них праймерами и зондами, которые были найдены нами ранее и применялись для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* методом ПЦР, или были взяты из литературных источников [28–35]. ДНК мишени и их расположение в геноме *Y. pestis* с координатами по геному референтного штамма CO92, приведены в табл. 1.

Для определения принадлежности исследуемых штаммов к виду *Y. pestis* были использованы ДНК-мишени 3а и yihN. Мишень 3а локализована в уникальном участке хромосомы *Y. pestis*, который специфичен для этого вида и отсутствует у близкородственной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* [30]. Эта мишень, наряду с видоспецифическим геном *yihN* была использована в ранее сконструированной тест-системе для выявления ДНК возбудителей чумы, туляремии и сибирской язвы методом мультилокусной ПЦР [30]. Нами на эти две ДНК мишени были рассчитаны праймеры и зонды для проведения анализа с использованием системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке. Зонды были иммобилизованы в ячейках слайда (рис. 1). При наличии в пробе ДНК *Y. pestis* происходит гибридизация с иммобилизованными на слайде видоспецифическими

зондами, что приводит к проявлению флуоресценции на слайде и оценивается как положительный результат. Наличие на слайде 2-х видоспецифических для *Y. pestis* зондов повышает надежность индикации возбудителя.

Для дифференциации штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов была выбрана мишень 45, расположенная на хромосоме в межгенном пространстве *ilvN-ilvB* [31]. В этом участке хромосомы у штаммов основного подвида выявлена делеция в 45 п.н., которая не встречается у других подвидов.

Для разделения штаммов неосновных подвидов – кавказского, улегейского и четырех биоваров центральноазиатского подвида использованы переменные участки хромосомы, содержащие специфические для подвидов и биоваров делеции. Так у штаммов кавказского подвида использован переменный участок гена *YPO0445*, в котором у них выявляется делеция в 91 п.н. (мишень Caucas). Для штаммов улегейского подвида маркерной является делеция размером 64 п.н. в гене *djIA* (мишень Ulegeic). У штаммов центральноазиатского подвида алтайский биовар содержит специфическую делецию в 90 п.н. в гене *YPO1226* (мишень Alt), гиссарский биовар – делецию в 205 п.н. в гене *YPO2267* (мишень His), таласский биовар –

Таблица 1

ДНК мишени, использованные в системы мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для индикации *Y. pestis* и дифференциации штаммов *Y. pestis*

DNA targets utilized in the system of multiplex PCR with hybridization-fluorescent registration of results on solid substrate for indication of *Y. pestis* and differentiation of *Y. pestis* strains

Название ДНК мишени	Расположение ДНК мишеней (координаты, ген, межгенное пространство) (по геному референтного штамма <i>Y. pestis</i> CO92, № NC_003143.1 в NCBI GenBank)
pla	6764–6890, ген <i>pla</i> плазмиды pPst
3a	2366690–2366836, ген <i>YPO2087</i>
caf	85967–86104, ген <i>caf1</i> плазмиды pFra
yihN	1899566–1899683, ген <i>yihN</i>
irp2	2157779–2157885, ген <i>irp2</i>
lcrV	21992–22105, ген <i>lcrV</i> плазмиды pCad
glpD	4421264–4421352, ген <i>glpD</i>
pCKF	3205–3332, ген AIS36186.1 плазмиды pCKF (KM112087.1)
Med24	996453–996622, межгенное пространство <i>gcvT-visC</i>
45	2579997–2580134, межгенное пространство <i>ilvN-ilvB</i>
Med70	2801519–2801743, ген <i>YPO2493</i>
Phage	2555484–2555568, ген <i>YPO2273</i>
Alt	1386400–1386623, ген <i>YPO1226</i>
His	2549643–2549773, ген <i>YPO2267</i>
Ul	528626–528795, ген <i>djIA</i>
Caucas	467244–467428, ген <i>YPO0445</i>
Tal	2714350–2714515, ген <i>YPO2412</i>
Micr	2537778–2537897, ген <i>araC</i>

делецию в 72 п.н. в гене *YPO2412* (мишень Tal), биовар *microtus* – делецию в 112 п.н. в гене *araC* (мишень *Micr*) [35].

Для разделения биоваров основного подвида использованы делеции, маркерные для восточного и средневекового биоваров. В гене *glpD* у штаммов восточного биовара (1.ORI) присутствует специфическая делеция в 93 п.н. [29]. Для типичных штаммов средневекового биовара характерно наличие делеции в 24 п.н. в межгенном пространстве *gcvT-visC* (мишень *Med24*) [33]. Для всех вышеназванных ДНК мишеней, которые содержат маркерные делеции, зонды рассчитаны таким образом, что они комплементарны последовательностям ДНК в участках делеции. Следовательно, штаммы, которые содержат эти делеции, не будут давать сигнала флуоресценции на твердой подложке в сравнении с положительными контролями (рис. 2).

У «атипичных» штаммов средневекового биовара филогенетической линии 2.MED0 из Центрально-Кавказского высокогорного очага делеция *Med24* отсутствует. Однако в их геноме присутствует уникальная плазмида рСКФ, не встречающаяся у других штаммов *Y. pestis*. В качестве ДНК мишени рСКФ используют ген *AIS36186.1*, локализованный на этой плазмиде [34]. По этой ДНК мишени у штаммов 2.MED0 на твердой подложке будет регистрироваться положительный сигнал гибридизации, который будет отсутствовать у всех других штаммов. Штаммы античного биовара основного подвида не несут в своем геноме маркерных делеций в мишенях *glpD* и *Med24*. Соответственно на твердой подложке у них будут отмечаться сигналы флуоресценции по этим мишеням и будет отсутствовать сигнал по мишени рСКФ.

В разработанную систему мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке также включены две ДНК мишени, позволяющие проводить идентификацию штаммов по их принадлежности к филогенетическим ветвям. Штаммы филогенетической ветви 1 (1.ANT и 1.ORI) имеют в своем геноме фаг *cusF*, являющийся их специфическим генетическим маркером. В качестве ДНК-мишени Phage нами использован ген *YPO2273* этого фага [36]. По этой ДНК мишени у штаммов филогенетических линий 1.ANT и 1.ORI будет проявляться сигнал флуоресценции. Для ветви 2 (2.ANT и 2.MED) характерным генетическим маркером является делеция в 70 п.н. в гене *YPO2493* [37]. Эта ДНК-мишень обозначена как *Med70*. В созданной системе мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке штаммы линий 2.ANT и 2.MED

(в том числе и линия 2.MED0) будут отличаться отсутствием сигнала флуоресценции по мишени *Med70*, который будет проявляться у всех других штаммов *Y. pestis*.

Для определения наличия генов основных факторов вирулентности *Y. pestis* в систему мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке включен зонд на ген *irp2* (мишень *irp2*) острова

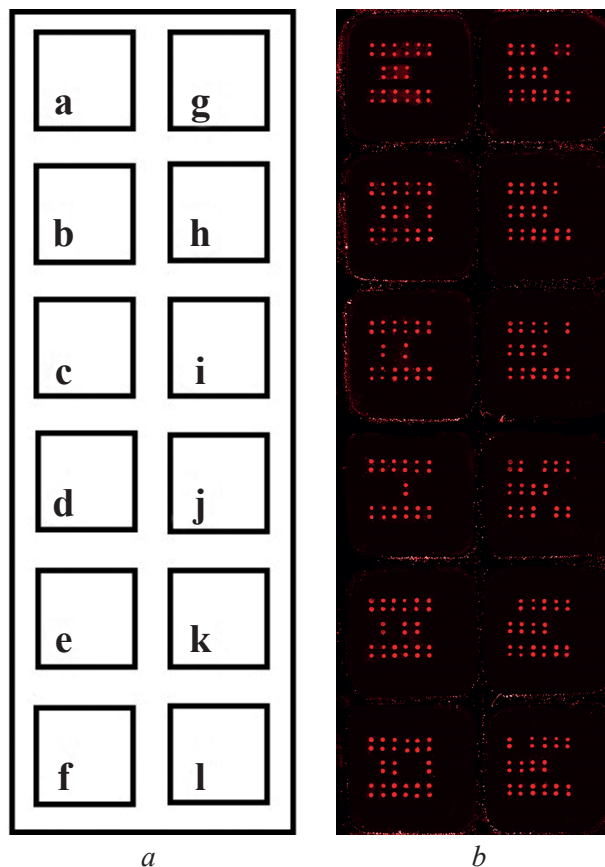


Рис. 2. *a* – Порядок расположения образцов штаммов *Y. pestis*, использованных в системе мультиплексных ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке: *a* – 0.ANT, *b* – 1.ANT, *c* – 2.ANT, *d* – 2.MED, *e* – 2.MED0, *f* – 1.ORI, *g* – 0.PE4a, *h* – 0.PE4h, *i* – 0.PE5, *j* – 0.PE2, *k* – 0.PE4m, *l* – 0.PE4t. *b* – Результат индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а также по наличию основных генов вирулентности.

Fig. 2. (a) Layout of samples of *Y. pestis* strains used in multiplex PCR system with hybridization-fluorescent registration of results on solid substrate: *a* – 0.ANT, *b* – 1.ANT, *c* – 2.ANT, *d* – 2.MED, *e* – 2.MED0, *f* – 1.ORI, *g* – 0.PE4a, *h* – 0.PE4h, *i* – 0.PE5, *j* – 0.PE2, *k* – 0.PE4m, *l* – 0.PE4t. (b) Results of indication and identification of the strains by their appurtenance to *Y. pestis* species, subspecies, biovars, phylogenetic lines, as well as by the presence of the major genes of virulence.

высокой патогенности НР1, ген *pla* (мишень *pla*) плазмиды pPst, ген *lcrV* (мишень *lcrV*) плазмиды pCad; ген *cafI* (мишень *caf*) плазмиды pFra [32]. При наличии в исследуемом образце этих генов после гибридизации с соответствующими зондами на твердой подложке будут проявляться сигналы флуоресценции.

В целом выбранный набор ДНК мишеней обеспечивает индикацию штаммов *Y. pestis* и дифференциацию штаммов различных биоваров, подвигов, филогенетических линий, а также позволяет установить наличие генов основных факторов вирулентности возбудителя.

Для анализа исследуемых образцов ДНК на основе системы мультиплексных ПЦР с гибридно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке образцы амплифицировали с использованием сконструированных праймеров в шести мультиплексных смесях в отдельных пробирках (первая смесь – мишени *pla*, *3a*, *cafI*, *yihN* вторая смесь – *irp2*, *lcrV*; третья смесь – *glpD*, *Pro*, *Med24*, *45*; четвертая смесь – *Med70*, *Phage*; пятая смесь – *Alt*, *His*, *Ul*; шестая смесь – *Caucas*, *Tal*, *Micr*)(табл. 2).

2. Регистрация результатов и анализ эффективности сконструированной системы мультиплексных ПЦР с гибридно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке

Индикация и идентификация штаммов *Y. pestis* осуществлялась по следующему алгоритму: на слайды с иммобилизованными на них зондами после блокировки поверхности наносили ПЦР продукты исследуемых штаммов, полученные в шести мультиплексных ПЦР-смесях. Проводили гибридизацию с использованием смеси, состоящей из ПЦР-продукта и гибридно-флуоресцентного буфера. Оценивали результаты и определяли внутривидовую принадлежность исследуемых штаммов в соответствии с таблицей по наличию/отсутствию сигналов флуоресценции по использованному ДНК мишеням.

Для анализа эффективности сконструированной системы мультиплексных ПЦР на с гибридно-флуоресцентным учетом результатов твердой подложке было использовано 114 штаммов *Y. pestis* различных подвигов, биоваров,

Таблица 2

Определение принадлежности исследуемого штамма к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, детекция генов факторов патогенности в системы мультиплексных ПЦР с гибридно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке

Determination of appurtenance of the studied strain to *Y. pestis* species, sub-species, biovars, phylogenetic lines, detection of pathogenicity gene-factors in the system of multiplex PCR with hybridization-fluorescent registration of results on solid substrate

Вид, подвид, биовар, линия	Наличие сигнала флуоресценции по ДНК-мишени			
	первая ПЦР-смесь			
	<i>pla</i>	<i>3a</i>	<i>cafI</i>	<i>yihN</i>
<i>Y. pestis</i>	+/-	+	+	+
Основной подвид	+	+	+	+
Кавказский подвид	-	+	+	+
Центральноазиатский подвид, алтайский биовар	+	+	+	+
Центральноазиатский подвид, гиссарский биовар	+	+	+	+
Центральноазиатский подвид, таласский биовар	+	+	+	+
Центральноазиатский подвид, биовар <i>microtus</i>	+	+	+	+
Улегейский подвид	+	+	+	+
	вторая ПЦР-смесь			
	<i>irp2</i>	<i>lcrV</i>		
Основной подвид	+	+		
Кавказский подвид	+	+		
Центральноазиатский подвид, алтайский биовар	+	+		
Центральноазиатский подвид, гиссарский биовар	+	+		
Центральноазиатский подвид, таласский биовар	+	+		
Центральноазиатский подвид, биовар <i>microtus</i>	+	+		
Улегейский подвид	+	+		

Таблица 2 (Окончание)

Вид, подвид, биовар, линия	Наличие сигнала флуоресценции по ДНК-мишени			
	третья ПЦР-смесь			
	glpD	Pro	Med24	45
Основной подвид, античный биовар	+	–	+	–
Основной подвид, восточный биовар	–	–	+	–
Основной подвид, средневековый биовар, линия 2.Med1	+	–	–	–
Основной подвид, средневековый биовар, линия 2.Med0	+	+	+	–
Неосновные подвиды	+	–	+	+
	четвертая ПЦР-смесь			
	Med70	Phage		
Основной подвид, античный биовар, линия 0.ANT	+	–		
Основной подвид, античный биовар, линия 1.ANT	+	+		
Основной подвид, античный биовар, линия 2.ANT	–	–		
Основной подвид, средневековый биовар, линия 2.MED1	–	–		
Основной подвид, средневековый биовар, линия 2.MED0	–	–		
Основной подвид, восточный биовар	+	+		
Неосновные подвиды	+	–		
	пятая ПЦР-смесь			
	Alt	His	Ul	
Центральноазиатский подвид, алтайский биовар	–	+	+	
Центральноазиатский подвид, гиссарский биовар	+	–	+	
Улегейский подвид	+	+	–	
Центральноазиатский подвид, таласский биовар	+	+	+	
Центральноазиатский подвид, биовар microtus	+	+	+	
Кавказский подвид	+	+	+	
Основной подвид	+	+	+	
	шестая ПЦР-смесь			
	Caucas	Tal	Micr	
Центральноазиатский подвид, алтайский биовар	+	+	+	
Центральноазиатский подвид, гиссарский биовар	+	+	+	
Улегейский подвид	+	+	+	
Центральноазиатский подвид, таласский биовар	+	–	+	
Центральноазиатский подвид, биовар microtus	+	+	–	
Кавказский подвид	–	+	+	
Основной подвид	+	+	+	

филогенетических линий. Паттерны гибридизации штаммов *Y. pestis* разных подвидов, биоваров и филогенетических линий на сконструированной системе мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для наглядности приведены на рис. 2. Анализ результатов исследования проводили в соответствии с табл. 2.

Для штаммов *Y. pestis* из очагов РФ и сопредельных стран получены следующие результаты.

Для 10 штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 2.ANT из Забайкальского степного очага было характерно наличие сигнала флуоресценции по мишеням yihN, 3a, Alt, His, Ul, Caucas, Tal, Micr, glpD, Med24, pla, caf1, irp2, lcrV и отсутствие по мишеням 45, Pro, Phage, Med70.

У 15 штаммов *Y. pestis* основного подвида средневекового биовара филогенетической линии 2.MED1, получивших наиболее широкое

распространение в очагах чумы на территории РФ (7 из 11 природных очагов) был отмечен сигнал флуоресценции по мишеням *yihN*, *3a*, *Alt*, *His*, *Ul*, *Caucas*, *Tal*, *Micr*, *glpD*, *pla*, *caf1*, *irp2*, *lcrV* и отсутствие сигнала по мишеням *45*, *Med24*, *Pro*, *Phage*, *Med70*.

Штаммы основного подвида средневекового биовара филогенетической линии 2.MED0, циркулирующих в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы, характеризовались наличием сигнала флуоресценции по мишеням *yihN*, *3a*, *Alt*, *His*, *Ul*, *Caucas*, *Tal*, *Micr*, *glpD*, *Med24*, *Pro*, *Phage*, *pla*, *caf1*, *irp2*, *lcrV* и отсутствием по мишеням *45*, *Phage*, *Med70*.

Штаммы центральноазиатского подвида алтайского биовара (0.PE4a), получившие распространение на территории Горного Алтая в России и Монголии, также имели характерный профиль – сигнал флуоресценции по мишеням *yihN*, *3a*, *45*, *His*, *Ul*, *Caucas*, *Tal*, *Micr*, *glpD*, *Med24*, *Med70*, *pla*, *caf1*, *irp2*, *lcrV* и отсутствие сигнала по мишеням *Alt*, *Phage*, *Pro*.

Для штаммов кавказского подвида (0.PE2), распространенных в природных очагах Кавказа и Закавказья, при проведении анализа было специфично наличие сигналов флуоресценции по мишеням *yihN*, *3a*, *45*, *His*, *Alt*, *Ul*, *Tal*, *Micr*, *glpD*, *Med24*, *Med70*, *caf1*, *irp2*, *lcrV* и отсутствие сигналов по мишеням *Caucas*, *Phage*, *Pro*, *pla*.

Эффективность разработанной системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке подтверждена для штаммов чумы других филогенетических линий (рис. 2, табл. 2).

На территории Российской Федерации, стран СНГ и сопредельных государств распространены штаммы разных филогенетических групп и обладающие разным эпидемическим потенциалом и вирулентностью. Определение принадлежности штамма к конкретной филогенетической ветви эволюции *Y. pestis* является важной задачей при проведении эпидемического расследования случаев чумы человека, заносов на территорию РФ, актов биотерроризма, поскольку позволяет определить происхождение штаммов и возможные пути их проникновения на территорию РФ. Кроме того, определение принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям и оценка их вирулентности быстрыми молекулярно-генетическими методами значительно упрощает паспортизацию штаммов и расширяет наше представление об эволюции и распространении этого патогена.

Эпидемическое расследование требует принятия быстрых решений и оценки масштаба требуемых мероприятий при ликвидации заноса или

вспышки чумы человека. Для этого важно получение наиболее полных сведений о штаммах возбудителя в максимально короткие сроки с высокой степенью надежности. Этим требованиям удовлетворяют системы мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке позволяющие детектировать большое количество маркеров.

В настоящее время таких систем, позволяющих проводить внутривидовую идентификацию штаммов *Y. pestis* по принадлежности к определенным филогенетическим ветвям и проводить оценку их вирулентности не существует. Разработаны системы, способные лишь осуществлять детекцию возбудителя чумы и других патогенов. Для решения задачи по определению принадлежности штаммов *Y. pestis* к филогенетическим ветвям и оценки их вирулентности нами был осуществлен поиск большого числа ДНК-мишеней для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*, рассчитаны праймеры и зонды, подобраны условия для проведения мультиплексных ПЦР, оптимизированы основные этапы проведения анализа на твердой подложке. В результате нами сконструирована система мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а также по наличию основных генов патогенности. Специфичность и эффективность подтверждена на 114 штаммах *Y. pestis* разных подвигов, биоваров, филогенетических линий. Разработанная система мультиплексных ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке может быть использована для молекулярно-генетической идентификации штаммов из природных очагов чумы с определением их принадлежности к основным филогенетическим ветвям и оценки патогенности, для повышения санитарно-эпидемиологического контроля территории РФ и стран СНГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. Plague. Fact sheets №267. November, 2014.
2. WHO Library Cataloguing in Publication Data. International health regulations (2005) - 2nd ed.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Попов Н.В. и др. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири [Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева]. М.: Медицина, 2004, 192 с.
4. Каримова Т.Ю., Неронов В.М. Природные очаги Палеарктики – М.: Наука, 2007, 199 с.

5. Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Носов Н.Ю. и др. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе полногеномного секвенирования штаммов из России и сопредельных государств. *Проблемы особо опасных инф.*, 2015, 4, 58–64.
6. Kuttyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V. L. et al. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 1106. doi: 10.3389/fmicb.2018.01106.
7. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1999, 96 (24), 14043–14048. PMID: 10570195.
8. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J. et al. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.*, 2010, 42 (12), 1140–3. doi: 10.1038/ng.705.
9. Cui Y., Yu C., Yan Y. et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2013, 110 (2), 577–582. doi: 10.1073/pnas.1205750110.
10. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M. et al. *Yersinia pestis* and the Plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2014, 14 (4), 319–26. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.
11. Bos K.I., Stevens P., Nieselt K. et al. *Yersinia pestis*: new evidence for an old infection. *PLoS One*, 2012, 7 (11):e49803. doi: 10.1371/journal.pone.0049803.
12. Eroshenko G.A., Nosov N.Yu., Krasnov Y.M. et al. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. *PLoS One*, 2017, 12 (10):e0187230. doi: 10.1371/journal.pone.0187230.
13. Kuttyrev V.V., Filippov A.A., Oparina O.S., Protsenko O.A. Analysis of *Yersinia pestis* chromosomal determinants Pgm⁺ and Pst⁺ associated with virulence. *Microb. Pathog.*, 1992, 12, 177–186.
14. Попов Ю.А., Проценко О.А., Анисимов П.И. и др. Обнаружение плазмид пестициногенности чумного микроба методом электрофореза в агарозном геле. *Профилактика особо опасных инфекций*, 1980, 20–25.
15. Проценко О.А., Анисимов П.И., Можаров О.Т. и др. Выявление и характеристика плазмид чумного микроба, детерминирующих синтез пестицина I, антигена фракция I и экзотоксина «мышинного» токсина. *Генетика*, 1983, 19 (7), 1081–1090.
16. Кутырев В.В. Попов Ю.А., Проценко О.А. Плазмиды патогенности чумного микроба. *Мол. генет., микробиол., вирусол.*, 1986, 6, 3–11.
17. Skurnic M., Wolf-Watz H. Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol. Microbiol.*, 1989, 3, 517–529.
18. Comelis J.R. The *Yersinia* Ysc-Yop «Type III» weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2002, 3, 742–752.
19. Nauth T., Huscka F., Schweizer M. et al. Visualization of translocons in *Yersinia* type III protein secretion machines during host cell infection. *PLoS Pathog.*, 2018, 14 (12):e1007527. doi: 10.1371/journal.ppat.1007527.
20. Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Yersinia pestis*. *Проблемы особо опасных инфекций*, 1998, 1, 11–12.
21. Tomioka K., Peredelchuk M., Zhu X. et al. A multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect bioterror pathogens in blood. *J. Mol. Diagn.*, 2005, 7 (4), 486–494.
22. Goji N., Macmillan T., Amoako K.K. New Generation Microarray for the Simultaneous Detection and Identification of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* in Food. *J. Pathog.*, 2012, 2012:627036. doi: 10.1155/2012/627036.
23. Пудова Е.А., Чеканова Т.А., Маркелов М.Л., и др. Разработка и апробация олигонуклеотидного биочипа для индикации возбудителей особо опасных инфекций. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*, 2014, 3, 13–19.
24. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней» Практическое руководство. Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. М.: ЗАО «Шико», 2013, 560 с.
25. Jin D.Z., Xu X.J., Chen S.H. et al. Detection and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and *Vibrio cholerae* O139 using oligonucleotide microarray. *Infect. Agent Cancer.*, 2007, 2 (1), 23. doi: 10.1186/1750-9378-2-23.
26. Marcy Y., Cousin P.Y., Rattier M. et al. Innovative integrated system for real-time measurement of hybridization and melting on standard format microarrays. *Biotechniques.*, 2008, 44 (7), 913–920. doi: 10.2144/000112758.
27. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во МГУ, 1970, 367 с.
28. Radnedge L., Gamez-Chin S., McCreedy P.M. et al. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 8, 3759–3762.
29. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M. et al. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). *J. Bacteriol.*, 2002, 184 (4), 1019–1027.
30. Куклев, В.Е. Конструирование тест-систем для выявления ДНК возбудителей чумы, туляремии и сибирской язвы методом мультилокусной ПЦР: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Рос. науч.-исслед. противочум. ин-т «Микроб» МЗ РФ, Саратов, 2007.
31. Одинокоев Г.Н., Павлова А.И., Анисимова Л.В. и др. Способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов и возбудителя псевдотуберкулеза методом полимеразной цепной реакции. Патент на изобретение RU 2425891, опубликовано 10.08.2010, бюл. №22.

32. Куклев В.Е., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Кутырев В.В. Набор и способ для ускоренной идентификации чумного микроба с одновременной дифференциацией вирулентных и авирулентных штаммов *Y. pestis*, определением их плазмидного профиля. Патент на изобретение RU 2473701, опубликовано: 27.01.2013, бюл. №3.
33. Одинок Г.Н., Павлова А.И., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного подвида средневекового и античного биоваров методом полимеразной цепной реакции. Патент на изобретение RU 2496882, опубликовано 27.10.2013, бюл. №30.
34. Оглодин Е.Г., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М. и др. Структурно-функциональный анализ криптических плазмид штаммов *Yersinia pestis* из двух природных очагов чумы России. *Проблемы особо опасных инф.*, 2015, 4, 82–85. doi: 10.21055/0370-1069-2015-4-82-85.
35. Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., и др. Подвидовая дифференциация штаммов *Yersinia pestis* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. *Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.*, 2017, 2, 22–27.
36. Оглодин Е.Г., Одинок Г.Н., Никифоров К.А. и др. Определение геновариантов штаммов *Yersinia pestis* основного подвида методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. *Проблемы особо опасных инфекций.*, 2014, 4, 52–55. doi: 10.21055/0370-1069-2014-4-52-55.
37. Одинок Г.Н., Никифоров К.А. Выявление новых вариабельных ДНК локусов, отличающих штаммы средневекового биовара от штаммов других биоваров возбудителя чумы. *Проблемы особо опасных инфекций.*, 2012, 4, 47–48. doi:10.21055/0370-1069-2012-4-47-48.

Designing a system of multiplex PCR with hybridization-fluorescent registration of results, on solid substrate, for indication and identification *Y. pestis* strains

K.A. NIKIFOROV^{1,*}, D.V. UTKIN¹, M.A. MAKASHOVA¹, L.M. KUKLEVA¹, G.A. EROSHENKO¹, V.V. KUTYREV¹

¹FGHI «Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare», 410005, Saratov

*e-mail: Nikiforov666666@mail.ru, rusrapi@microbe.ru

Received January 22, 2020

Revised March 12, 2020

Accepted May 21, 2020

Abstract—Plague agent strains differ in intraspecific appurtenance, place of origin, as well as their virulence. Development of a rapid and reliable means of *Y. pestis* strain indication, their identification by intra-specific appurtenance and assessment of their virulence is a relevant issue. To solve the task, we have constructed a system of multiplex PCR with hybridization-fluorescent registration of results on solid substrate, for indication and identification of strains by their belonging to *Y. pestis* species, sub-species, biovars, phylogenetic lines, also by the presence of the main gene-factors of pathogenicity of chromosomal and plasmid localization. Its effectiveness is confirmed on 114 plague agent strains of various origins. The developed system of multiplex PCR with hybridization-fluorescent registration of results on solid substrate, can be applied for molecular-genetic identification of strains from natural plague foci with specification of their appurtenance to the main phylogenetic branches and assessment of virulence, for enhancement of sanitary-epidemiological control of RF territories and CIS member-states.

Key words: plague pathogen, strains, indication and identification, PCR

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-46-56