

УДК 601.2:579.8

Терлецкий В.П., Усенбеков Е.С., Жансеркенова О.О.

ФГБНУ «Всероссийский НИИ генетики и разведения», Санкт-Петербург, Россия  
НАО «Казахский национальный аграрный университет», Республика Казахстан

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ ДРИМ (ДВОЙНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ И ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ МЕЧЕНИЕ)

### Аннотация

Разработанный метод быстрого генотипирования микроорганизмов (метод ДРИМ) был использован для идентификации штаммов отдельных патогенных серотипов *Salmonella* и *Proteus*. Изоляты выращивали из тканей и помета птиц в разные годы и из разных мест. Результаты генотипирования штаммов согласуются с эпизоотологическими данными, таким образом, этот метод может быть рекомендован для практического применения при выявлении путей распространения инфекций и локализации источника патогенов бактериальной природы.

**Ключевые слова:** генотипирование, бактериальные изоляты, патогены, сальмонелла, протей, эндонуклеазы рестрикции.

### Введение

Разработка методов быстрой идентификации бактериальных штаммов приобретает в настоящее время особую актуальность [1,2,3]. Это связано циркулированием возбудителей во внешней среде и периодическими эндемическими вспышками заболеваний [4]. В птицеводстве инфекционные заболевания, прежде всего сальмонеллез несут особую угрозу [5], так как на птицефабриках птица находится в условиях, благоприятствующих передаче микроорганизмов между особями (скученность содержания, запыленность помещений и т.д.). Для надежной идентификации и паспортизации бактериальных штаммов необходимо применение современных методик генотипирования [1]. Генотипирование позволяет присвоить молекулярно-генетический «штрих-код» каждому штамму, проследить пути передачи и выявить источники инфекции. В случае если два изолята, выделенные из разных мест, будут иметь идентичный генотип, можно с высокой степенью уверенности говорить об эпизоотическом контакте. Помимо этого, паспортизация важна при хранении коллекций штаммов, в том числе вакцинных, в лабораторных условиях. Идентичность генотипа микроорганизма, выделенного из особи до и после проведения лечебных мероприятий, свидетельствует о неэффективности последних. В то же время, если выявлен другой генотип – это является прямым доказательством успешности лечения, направленного на борьбу с возбудителем выявленного штамма и последующего заражения другим штаммом. Существует множество методов типирования микроорганизмов. В настоящее время однозначно доказано, что методы, основанные на полиморфизме геномной ДНК (генотипирование), являются наиболее чувствительными и воспроизводимыми [8].

На сегодня самым точным методом генотипирования является метод ДРИМ (двойное расщепление и избирательное мечение), который впервые был разработан для клинических изолятов патогенных микроорганизмов - *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella spp.* [9]. Результатом генотипирования методом ДРИМ является группа фрагментов ДНК в виде полос на фильтре, распределение которых специфично для каждого штамма или близкородственной группы штаммов. Точность идентификации штаммов, рассчитываемая по индексу дискриминации [7] превышает точность текущего «золотого стандарта» генотипирования пульс-гель электрофореза и достигает для псевдомонад 0,98, сальмонелл – 0,96.

Цель данной работы состояла в выяснении соответствия данных генотипирования микроорганизмов (метод ДРИМ) и эпизоотологических данных (время, место взятия образца). Данный метод генотипирования впервые испытывается на бактериальных изолятах, выделенных на территории Российской Федерации.

#### **Материалы и методы исследования**

Материалом исследования служили 9 бактериальных изолятов сальмонелл (*S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium*) и 8 изолятов протей (*P. vulgaris* и *P. mirabilis*), выделенных в ГНУ ВНИВИП (Санкт-Петербург-Ломоносов) из тканей или помета птиц. Экстракцию геномной ДНК проводили традиционным способом с применением фенольно-хлороформенной экстракции. Полученную ДНК промывали 70% этанолом, подсушивали и растворяли в буфере TE (10 мМ трис-HCL, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0).

Метод ДРИМ основан на одновременном расщеплении геномной ДНК микроорганизма двумя рестрикционными эндонуклеазами и избирательном мечении отдельных фрагментов ДНК. Преимуществом метода является быстрота (8 часов в сравнении с 3 сутками в методе пульс-гель электрофорез), высокая точность и отсутствие ПЦР этапа. В связи с тем, что у многих видов микроорганизмов геном к настоящему времени полностью секвенирован, т.е. определена последовательность нуклеотидов в геномной ДНК, есть возможность теоретически предсказывать количество фрагментов ДНК, получаемых при расщеплении каждой из рестриктаз, а также после двойного расщепления одновременно двумя рестриктазами. Для этого мы используем доступную в интернете программу (<http://insilico.ehu.es/DDSL>). Программа была разработана исследователями из Испании [6], которые также участвовали в разработке метода ДРИМ для клинически важных видов патогенных бактерий в рамках совместных грантов НАТО-Россия.

Поиск *in-silico* выявил, что лучшей крупнощепляющей рестриктазой для протеев является *SgsI*, имеющей сайт узнавания и расщепления GG↓CGCGCC. Данный фермент имеет несколько десятков сайтов расщепления в геноме протей и производит «липкие» концы, которые метятся биотинилированным дезоксицитозинном (Bio-dCTP) с помощью Taq-полимеразы [9;10]. Получаемые фрагменты ДНК не могут быть разделены в обычном агарозном геле, так как являются слишком крупными. Поэтому, в реакцию вводили мелкощепляющую рестриктазу *Eco32I*, имеющую около тысячи сайтов расщепления и узнающую последовательность GAT↓ATC. В результате такого двойного расщепления размер фрагментов ДНК является оптимальным для разделения в агарозном геле. Таким образом, в реакционной смеси присутствует ограниченное число меченых фрагментов ДНК, которые могут быть разделены и визуализированы. Выполнение генотипирования сальмонелл проводили аналогичным способом за исключением подбора других ферментов рестрикции: крупнощепляющая рестриктаза *XbaI* и мелкощепляющая рестриктаза *PstI*. Особенностью мелкощепляющих рестриктаз является то, что получаемые фрагменты ДНК имеют либо тупые, либо 3'-выступающие концы, которые не могут включить Bio-dCTP. Двойное расщепление и избирательное мечение (ДРИМ) сводится к внесению в микропробирку 15 мкл воды, 2 мкл 10-кратного буфера R (Fermentas™), 2 мкл выделенной геномной ДНК и 1 мкл ферментной смеси (две рестриктазы, Taq-полимераза и метка Bio-dCTP). Инкубация проводится в течение 2-3 часов при 37°C. Электрофорез проводили в 0,8% агарозном геле. Перенос разделенных фрагментов ДНК на нейлоновый фильтр осуществляли немедленно после электрофореза в дистиллированной воде на вакуумном приборе (денатурация и нейтрализация ДНК не требуется). Детекция фрагментов ДНК на фильтре проводится с помощью обычной цветной химической реакции, основанной на выявлении щелочной фосфатазы.

### Результаты исследования

Разработанный нами метод ДРИМ позволяет идентифицировать одновременно около 35 фрагментов ДНК, что является рекордным показателем для методов генотипирования (RAPD – 5-10 фрагментов, пульс-гель электрофорез – 15-20 фрагментов). При накоплении достаточного числа мутаций в штаммах любой метод генотипирования начинает дискриминировать штаммы, причем, чем большее число фрагментов ДНК учитывается в анализе, тем более чувствительным становится данный метод. В отдельных случаях штаммы не отличались по распределению фрагментов ДНК на фильтре, что свидетельствует о генетической близости этих штаммов. Вероятно, они являются генетически идентичными, либо отличаются друг от друга на уровне всего одного или нескольких генов, полиморфизм которых ускользает при скрининге.

Генотипирование методом ДРИМ геномной ДНК бактерий выявило идентичность трех изолятов сальмонеллы галлинарум (*S. gallinarum*) – 2Sg, 3Sg и 4Sg и сальмонеллы энтеритидис (*S. enteritidis*) – 1Se и 3Se (таблица 1). Среди 8 изолятов *Proteus* два оказались идентичными (изоляты 6 и 7).

Таблица 1 Генотипирование изолятов *Salmonella spp.* и *Proteus* методом ДРИМ (двойное расщепление и избирательное мечение).

<i>Salmonella spp.</i> ( <i>XbaI/PstI</i> )		<i>Proteus vulgaris/mirabilis</i> ( <i>SgsI/Eco32I</i> )	
№ изолята*	генотип	№ изолята*	генотип
1S.t.	1	1Pv	1
1S.g.	2	2Pm	2
2S.g., 3S.g., 4S.g.	3	5Pv	3
1S.e., 3S.e.	4	6Pv, 7Pv	4
4S.e.	5	8Pv	5
5S.e.	6	11Pm	6
		12Pv	7

\* St – *S. typhimurium*, Sg – *S. gallinarum*, Se – *S. enteritidis*

\* Pv – *P. vulgaris*, Pm – *P. mirabilis*

Данные генотипирования методом ДРИМ хорошо согласуются с эпизоотологическими данными (место, время взятия образцов). В частности, изоляты *S. gallinarum* были выращены из тканей больных кур, находившихся в контакте в одном хозяйстве (Узбекистан). Идентичность генотипа сальмонелл свидетельствует о заражении кур друг от друга одним и тем же штаммом патогена. Бактериальные культуры *S. gallinarum* выращивались из разных органов пораженных кур: 2S – сердце, февраль 2009 г., 3S – печень, февраль 2009 г., 4S – яичные фолликулы, февраль 2009 г. Генотипирование сальмонеллы энтеритидис выявило идентичность изолятов, выделенных от бройлера в Белгородской области (2012 г.) и особи в хозяйстве Ленинградской области (2006 г.). Это указывает на возможную передачу возбудителя между этими хозяйствами посредством какого-либо контакта.

Изоляты протей по данным генотипирования представляли из себя отдельные отличающиеся штаммы. Исключение составляют изоляты 6 и 7. Данные культуры были выращены из помета перепелок в птицеводческом хозяйстве Ленинградской области в 2010 и 2011 годах. Все остальные образцы были взяты из других мест.

Следующий этап работы подразумевал количественную оценку различий между бактериальными штаммами. Для достижения этого были подсчитаны количество общих и отличающихся фрагментов ДНК на картинах ДРИМ (таблица 2). Штамм 1S.t. (*Salmonella*

*typhimurium*) значительно отличался от остальных штаммов. В то же время, штаммы *Salmonella gallinarum* и *Salmonella enteritidis* отличались друг от друга в меньшей степени.

Таблица 2 Различия между изолятами *Salmonella typhimurium* (изолят 1S.t.), *Salmonella gallinarum* (изоляты 1S.g.-4S.g.) и *Salmonella enteritidis* (изоляты 1S.e., 3S.e.-5S.e.) по числу отличающихся фрагментов при генотипировании методом ДРИМ

	1S.t.	1S.g.	2S.g.	3S.g.	4S.g.	1S.e.	3S.e.	4S.e.	5S.e.
1S.t.	0	36	34	34	34	33	33	33	41
1S.g.		0	13	13	13	14	14	14	35
2S.g.			0	0	0	14	14	14	32
3S.g.				0	0	14	14	14	32
4S.g.					0	14	14	14	32
1S.e.						0	0	0	22
3S.e.							0	0	22
4S.e.								0	22
5S.e.									0

Аналогичный подсчет числа общих и отличающихся фрагментов ДНК у изолятов *Proteus* (кроме образца 2) выявил генетическую удаленность изолята 11 (*P.mirabilis*) от остальных изолятов (*P. vulgaris*). Количество отличающихся фрагментов ДНК составило от 40 до 47. Изоляты *P.vulgaris* отличались друг от друга на 1-11 фрагментов. Изоляты 6 и 7 не имели отличий по фрагментам ДНК, т.е. были генетически идентичными (таблица 3).

Таблица 3 Различия между изолятами *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* по числу отличающихся фрагментов при генотипировании методом ДРИМ (изолят 2 отсутствует)

№ изолята	1P.v.	5P.v.	6P.v.	7P.v.	8P.v.	11P.m.	12P.v.
1P.v.	0	5	1	1	8	40	10
5P.v.		0	3	3	7	45	10
6P.v.			0	0	11	40	11
7P.v.				0	11	40	11
8P.v.					0	45	7
11P.m.						0	47
12P.v.							0

### Заключение

Метод ДРИМ позволяет идентифицировать отдельные штаммы и группы близкородственных штаммов микроорганизмов родов *Salmonella* и *Proteus*. Метод можно эффективно использовать при нахождении источника инфекции и выявлении путей распространения бактериального патогена во внешней среде.

### Литература

1. *Rodrfiguez-Gonzalez, E. Selection of prepuberal Ботина С.Г.* Молекулярно-генетическая идентификация, ДНК-генотипирование и паспортизация молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* // Доклады на V Съезде генетиков и селекционеров. Москва. 2009. С. 49.

2. Жебрун А.Б., Мукомолов С.А., Нарвская О.В. Генотипирование и субтипирование патогенных микроорганизмов в развитии технологий эпидемиологического надзора // Медицинский академический журнал. 2009. №4. С. 59-67.

3. Топальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Фенотипическое и молекулярно-генетическое типирование сальмонелл: реалии и перспективы // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005. №6. С.88-93.

4. Добрина М.Н. Нужен постоянный контроль сальмонеллеза // Животноводство России. 2011. №3. С. 11-13.

5. Борисенкова А.Н., Новикова О.Б., Байбарак М.Н., Варюхин А.В. Эффективность препаратов разных классов для контроля сальмонеллы энтеритидис // Материалы XVI конференции «Достижения в современном птицеводстве: исследования и инновации». Сергиев Посад, 2009. С. 344-347.

6. Bikandi, J., R. San Millán, A. Rementeria, and J. Garaizar. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction // Bioinformatics. 2004. Vol.22. P. 798-799.

7. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity // J. Clin. Microbiol. 1988. Vol.26. P.2465-2466.

8. Lukinmaa, S., U-M. Nakari, M. Eklund, and A. Siitonen. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens // APMIS. 2004. Vol.112. P.908-929.

9. Terletskiy V., Kuhn G., Francioli P., Blanc D. Application and evaluation of double digest selective label (DDSL) typing technique for *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates // J. Microbiol. Methods. 2008. Vol.72. P. 283-287.

Терлецкий В.П., Усенбеков Е.С., Жансеркенова О.О.

#### МИКРООРГАНИЗМДЕР ШТАМДАРЫН ҚОСАРЛАП ЫДЫРАТУ ЖӘНЕ ІРІКТЕП БЕЛГІ САЛУ ӘДІСІМЕН ГЕНОТИПТЕУ

##### **Аңдатпа**

Salmonella және Proteus жеке патогендік серотиптерін идентификациялау үшін микроорганизмдерді жылдам (ЕКІ РЕТ РЕСТРИКЦИЯЛАУ ЖӘНЕ ТАҢДАП БЕЛГІ САЛУ) генотиптеу әдісі ойлап табылған. Изоляттар әр жылдары және түрлі аумақтардан алынған ұлпалар мен құс нәжістерінен алынған. Штаммдарды генотиптеу нәтижелері эпизоотиялық мәліметтер нәтижелерімен толықтай сәйкес келеді, сондықтан аталған әдіс бактериялық індеттің шығу көздері мен таралуын анықтауға мүмкіндік беретін сезімтал тәсіл ретінде өндіріске ұсынылады.

**Ключевые слова:** генотиптеу, бактериальдық изоляттар, патогендер, сальмонелла, протей, рестрикция эндонуклеазасы.

Terletskiy V.P., Ussenbekov Y.S., Zhanserkenova O.O.

#### GENOTYPING OF MICROORGANISM STRAINS BY DDSL (DOUBLE DIGEST SELECTIVE LABEL) METHOD

##### **Annotation**

Fast microorganism genotyping technique which was developed earlier (DDSL method) has been applied for strain identification of certain pathogenic serotypes of Salmonella and Proteus species. Isolates have been grown from tissues and chicken dung in various years and different locations. It has been demonstrated that the method was in good agreement with epizootic data

and thus can be recommended for practical use in elucidation of infection transmission and localization of bacterial pathogen source

**Keywords:** genotyping, bacterial isolates pathogens, Salmonella, Proteus, restriction endonuclease.

## ӘОЖ 574.5

Уразбекова Г.Е., Қасенова Г.Т., Музапбаров Б., Тулемисова Ж.К.

*Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы қ.*

### АЛТЫН БАЙЫТУ ФАБРИКАСЫНЫҢ ӨНДІРІСТІК ЛАСТАНҒАН ҚАЛДЫҚ СУЛАРЫНЫҢ МИКРОФЛОРАСЫН ЗЕРТТЕУ

#### **Андатпа**

Алтын байыту фабрикасының өндірістік ағынды суларының рН-ы сілтілі, нормативке сай «Сорбция жинақтаушысы» және «Флотация жинақтаушысы» су үлгілерінде қарастырылған 12-ң түгелге жуық мөлшері нормативтерден 2 есе жоғары, ал биологиялық «өзіндік» тазартудан өткен су «Ескі жинақтаушысы» үлгісінде – 3-еуі:  $SO_4^{2-}$ ,  $As^{2+}$ ,  $Cl^-$  иондарының кездесуі көп мөлшерде кездесетіндігі анықталынды. Алтын байыту фабрикасының өндірістік ағынды суларынан бөлініп алынған доминантты микроб дақылдары морфодақылдық зерттеулер бойынша келесі туыстарға жатқызылды: *Bacillus*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*.

**Кілт сөздер:** ағынды су, қалдық-жинақтаушы, микрофлора, микроорганизм, цианид.

#### **Кіріспе**

Қазіргі күні әлемде минералды шикізатты игерудегі қолданатын технологиялар нәтижесінде қалдық қоймаларының саны күрт ұлғаюда. Жыл сайын ҚР алтынқұрамды шикізатты шығару артуда, сонымен қатар, минералды шикізаттың үлкен көлемді массасы өңделіп, соның есебінен тау-кен өндірісінің қатты және сұйық қалдықтары қалдық қоймаға жиналып өндіріс кәсіпорнына экономикалық тиімсіз және қоршаған ортаға экологиялық проблемаларды туындатады [1, 2].

Өндірістік ағынды суларда цианидтер, роданидтер, темір, ауыр металл тұздары, түрлі-түсті металлдар жинақталуына байланысты, технологиялық процесс кезінде судың қайта қолдануы, өнеркәсіп балансындағы табиғи су мен су көлемін пайдалануын жоғарылатады [3, 4]. Сондықтан байыту фабрикаларында өндірістік ағынды суларды өндірістік су ретінде қайта айналымына кіргізуөзекті мәселелердің бірі болып табылады.

Ластанған ағынды сулардың «өзіндік тазалау» қабілеті микрофлорасымен анықталады. Бұзылған аймақтардың қарқынды «өзіндік тазалауы» толығымен биологиялық ыдырату факторлары немесе нысандары бактериялар, балдырлар, микробалдырлар және микросаңырауқұлақтар көмегімен жүзеге асырылады. Бұл микробиоценоз өкілдері бір-бірімен күрделі қарым-қатынастар (метабиоз, симбиоз, антагонизм) арқылы біртұтас кешен түзеді де, судың «өзіндік тазалау» қарқындылығына себеп болады [5].

Судың «өзінді тазалау» қарқындылығы көп факторларымен анықталады, соның ішінде маңыздылары: су құрамы, температурасы, рН деңгейі, органикалық заттардың және улы қосылыстардың мөлшері болып табылады [6].

Ластанған суларды тазалауында сулардың «өзіндік тазалау» қабілетін ескеру қажет, сондықтан, ластанған өндірістік сулардың химиялық және микробиологиялық сандық көрсеткіштерінің анықталуы маңызды.