

Идентификация генетических вариантов актуальных патогенов животных

Терлецкий В.П., доктор биологических наук, главный научный сотрудник

Тыщенко В.И., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных (ВНИИГРЖ) – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства - ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»

Аннотация: *Циркулирование патогенных микроорганизмов у птиц приводит не только к проблемам в реализации генетического потенциала продуктивности птицы, но и к падежу. Все это наносит существенный экономический ущерб как крупным птицефабрикам, так и фермерским хозяйствам. В настоящее время особенно актуальным являются латентные инфекции, вызываемые условно-патогенной микрофлорой. Понимание механизмов передачи возбудителей, своевременная идентификация бактериальных штаммов, выявление штаммов с эпидемическим потенциалом, определение наличия у бактерий генетических структур, придающих свойства антибиотикорезистентности – все это необходимые элементы современной профилактической работы с птицей. Цель работы состояла в сравнении эффективности двух методов идентификации бактериальных штаммов сальмонелл и золотистого стафилококка для использования в практике птицеводства. Метод, основанный на двойном расщеплении и избирательном мечении фрагментов ДНК (ДРИМ) показал более высокую эффективность в сравнении с фаготипированием, в котором используется оценка чувствительности изолятов к панели отобранных фагов. Индекс дискриминации, рассчитанный по результатам анализа 28 изолятов сальмонелл, составил 0,96 и 0,88 для ДРИМ-генотипирования и фаготипирования соответственно. Таким образом, первый метод показал свое преимущество в плане идентификации бактериальных штаммов.*

Ключевые слова: *генотипирование, штаммы, сельскохозяйственная птица, бактерии, патогены.*

Введение. Несмотря на принятые протоколы вакцинирования промышленной птицы, проблема периодических вспышек инфекционных заболеваний не теряет остроту [1]. Особенно актуальным остается вопрос снижения продуктивных признаков вследствие вялотекущих инфекций, вызванных условно-патогенной микрофлорой. Важно отличать эндемические случаи заболевания, которые могут одновременно наблюдаться у большого числа особей, от эпидемической вспышки. В последнем случае инфекция вызывается одним штаммом бактерии, в отличие от эндемических случаев вследствие циркулирования в популяции птицы многих бактериальных штаммов, что часто является

следствием активизации эндогенной микрофлоры. Среди наиболее распространенных инфекций у птиц необходимо отметить кишечную палочку, золотистый стафилококк и сальмонелл. В частности, у водоплавающих птиц доля золотистого стафилококка в общей массе всей микрофлоры составляет 32,7% [2]. Мониторинг состояния популяции и контроль над штаммовым разнообразием выявляемых бактерий является важным элементом в превентивной медицине и ветеринарии [3]. Определение путей передачи возбудителя и выявление источника инфекции в объектах внешней среды позволяет вовремя провести эффективные профилактические мероприятия, такие как выбраковка заболевших особей,

введение карантинного режима, проведение внеплановой вакцинации всего поголовья и т.д.

Идентификация бактериальных штаммов может осуществляться самыми разными методами [4,5], включая рамановскую спектроскопию и секвенирование [6,7]. В последнее время предпочтение отдается методам, использующим ДНК-технологии, однако методы, основанные на антигенных особенностях штаммов (серотипирование) и разной чувствительности к бактериофагам (фаготипирование) все еще широко распространены в практике ветеринарных лабораторий вследствие хорошо отработанных протоколов проведения исследований и простоты анализа. Известно около 2300 серовари-





антов сальмонелл, из них более 230 выделено от птиц [8].

Цель исследований – сравнить эффективность применения двух альтернативных методов типирования бактерий с точки зрения возможности использования в практике лабораторий.

Материал и методика исследований. Объектом исследования служили изоляты бактерий *Salmonella enterica* у людей (28 изолятов) и *Staphylococcus aureus*, выделенных у кур (8 изолятов), индеек (20 изолятов) и свиней (9 изолятов) с клиническими признаками заболевания. Фаготипирование осуществляли по общепринятой методике с использованием панели бактериофагов. Учет чувствительности бактерий проводили по способности фагов вызывать лизис клеток. На основании этих данных изолятам присваивали фаготип.

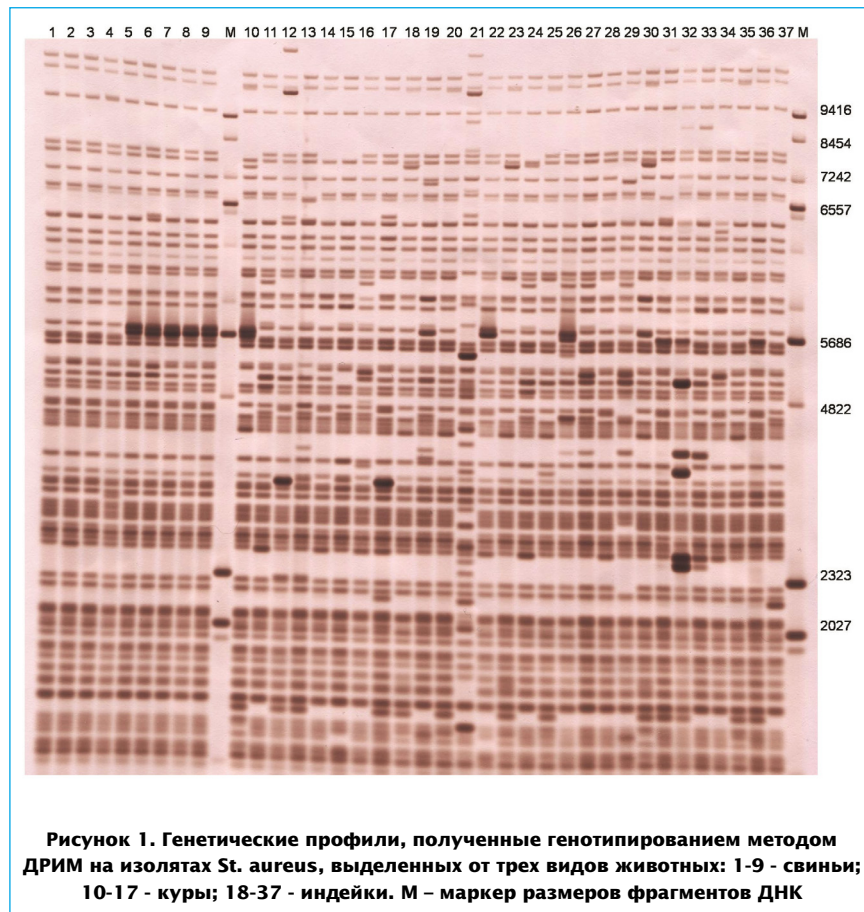
Мультилокусное генотипирование проводили по методике

двойного расщепления и избирательного мечения ДНК (ДРИМ), основанного на одновременном использовании двух эндонуклеаз рестрикции, меченого дезоксицитозинтрифосфата (Bio-dCTP) и Taq-полимеразы [9]. В качестве ферментов рестрикции в отношении *S. enterica* использовали *XbaI/PstI*, которые хорошо себя зарекомендовали в проведенных ранее исследованиях [10]. Пара ферментов *XhoI/BsuRI* была использована на изолятах *St. aureus*. Вкратце, методика ДРИМ сводилась к проведению реакции в микропробирке в смеси, стоящей из ферментов рестрикции, метки и полимеразы. Первый фермент производит ограниченное число так называемых «липких концов», способных к включению новых нуклеотидов, второй производит тупые либо 3'-выступающие концы, которые не могут включить метку (реакция

полимеризации ДНК идет только в одном направлении – от 5' к 3' концу фрагмента ДНК). При этом происходят одновременно две реакции: расщепление геномной ДНК бактерии ферментами рестрикции и реакция заполнения 3'-усеченного конца фрагмента ДНК меченым нуклеотидом (Bio-dCTP). В связи с тем, что сайт расщепления ферментов *XhoI* имеет следующий вид: C'TCGAC, встройка Bio-dCTP во вторую позицию может произойти только после включения dTTP, поэтому в реакционную смесь вводили этот немеченый нуклеотид. При генотипировании *S. enterica* с использованием *XbaI/PstI* первым включаемым нуклеотидом является dCTP, таким образом, Bio-dCTP может применяться без других нуклеотидов. Второй фермент рестрикции нужен для укорочения длинных меченых фрагментов ДНК до размера, который подходит для разделения в обычном 0,8% агарозном геле (500-20000 пар оснований). После проведения реакции ДРИМ и электрофореза ДНК из геля переносится под вакуумом на нейлоновый фильтр. Процедура занимает 20-30 мин и проводится в дистиллированной воде. Меченые фрагменты ДНК визуализируются на фильтре в цветной реакции с использованием реагентов нитро-блутетразолий фосфат (NBT) и хлоро-бромоиндолил-фосфат (BCIP).

Каждый генетически отличающийся штамм будет характеризоваться своим уникальным набором цветных полос на фильтре, это, своего рода, «штрих-код» данного штамма.

Результаты исследований и их обсуждение. Генотипирование *St. aureus* методом ДРИМ привело к формированию 40-50 четко различимых фрагментов ДНК (рис. 1). Обращает на себя





внимание сходство генетических профилей, полученных на разных видах животных. Это не удивительно, так как многие авторы отмечают выраженную клональность *St. aureus* и возможность перезаражения одним штаммом разных видов животных и человека [11]. Это одна из особенностей данного патогена, ряд других бактерий не имеют такой ярко выраженной клональности. Особенно актуальным является широкое распространение устойчивого к метициллину штамма ST398, инфицирование которым отмечено во многих странах. Несмотря на сходство в количестве и распределении фрагментов ДНК, можно увидеть отдельные межвидовые различия в профилях, что свидетельствует о высокой разрешающей способности ДРИМ-генотипирования (рис. 1). В частности, в районе длин рестрикционных фрагментов 5686 пар оснований отмечается присутствие сильно окрашенного фрагмента (вероятно, группа одинаковых или очень близких по размеру фрагментов) у 5 из 9 изолятов от свиней. Такой фрагмент выявили только у одного изолята от восьми кур (дорожка №10) и двух изолятов, полученных от двадцати индеек (дорожки №№22 и 26). Эти данные подтверждают, с одной стороны, генетическую близость штаммов стафилококка, циркулирующего у разных видов животных, а с другой – наличие видоспецифических особенностей отдельных штаммов бактерий, предпочитающих инфицировать определенные виды макроорганизма.

Работа по выявлению типов сальмонелл была проведена на 28 изолятах патогена, при этом разрешающую способность генотипирования методом ДРИМ и фаготипирования сравнивали по

индексу дискриминации (вероятность, что все изоляты в группе будут разделены на отдельные различающиеся типы).

Во многих случаях одинаковые фаготипы были разделены на различные генотипы при генотипировании (табл. 1). Эпидемическая вспышка TIA1 включала ДРИМ-генотип 1 (изоляты 3, 12, 14, 15, 18, 22 и 25) и генотипы 2 и 3 (изоляты 23 и 24, соответственно); при вспышке TIA2 все три изолята (13, 16 и 17) относились к генотипу 1. Примечательно, что все указанные изоляты не были разделены методом фаготипирования и принадлежали к одному

фаготипу 4. Таким образом, четко прослеживается более высокая дискриминационная способность метода ДРИМ. Только в двух случаях ДРИМ-генотипирование не разделило два разных фаготипа на разные генотипы (изоляты 55 и 56 дали разные фаготипы 6 и 7, но были не различимы и дали один ДРИМ-генотип 4; изоляты 54 и 115 с фаготипами 7 и 4 также не были разделены при ДРИМ-генотипировании).

Заключение. Таким образом, подтверждено генетическое сходство штаммов *St. aureus* у разных видов животных, что говорит о способности бактерии

Таблица 1. Сравнение разрешающей способности двух методов генотипирования бактериальных изолятов (ДРИМ и фаготипирования) с использованием 28 изолятов *Salmonella enterica* серотип Enteritidis

ID изолята	Год выделения	Тип ДРИМ	Фаготип	Эпидемическая вспышка
3	1994	1	4	TIA1
12	1994	1	4	TIA1
13	1994	1	4	TIA2
14	1994	1	4	TIA1
15	1994	1	4	TIA1
16	1994	1	4	TIA2
17	1994	1	4	TIA2
18	1994	1	4	TIA1
22	1994	1	4	TIA1
23	1994	2	4	TIA1
24	1994	3	4	TIA1
25	1994	1	4	TIA1
54	1990	1	7	-
55	1991	4	6	-
56	1991	4	7	-
57	1992	5	4	-
58	1992	6	6	-
60	1993	7	4b	-
61	1993	8	5	-
63	1993	9	6	TIA8
65	1993	10	6	TIA8
109	1996	11	6a	-
110	1996	12	6a	-
111	1996	13	8	-
112	1996	14	8	-
115	1997	1	4	-
116	1997	15	6a	-
117	1997	16	6a	-
количество типов		16	7	
индекс дискриминации (D)		0,96	0,88	



преодолевать видовые барьеры. Несмотря на это отмечены некоторые особенности штаммов, выделенных от разных видов. Метод генотипирования ДРИМ превосходит по своей разрешающей способности фаготипирование (индекс дискриминации по *Salmonella enterica* составил для них 0,96 и 0,88 соответственно).

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания №121052600352-3.

Литература

1. Добрин М. Н. Нужен постоянный контроль сальмонеллеза // Животноводство России. - 2011. - №3. - С. 11-13.
2. Новикова О.Б. Контроль и профилактика бактериальных болезней водоплавающей птицы / О.Б. Новикова, Н.В. Никитина, М.А. Павлова, О.С. Карпова, А.А. Бартнев // Птицеводство. - 2019. - №11-12. - С. 93-99.
3. Жебрун А.Б. Генотипирование и молекулярное маркирование бактерий и вирусов в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями / А.Б. Жебрун, С.Л. Мукомолов, О.В. Нарвская // Журнал микробиол.,

эпидемиол. и иммунобиол. - 2011. - №4. - С. 28-36.

4. Turki Y. Comparison of five molecular subtyping methods for differentiation of *Salmonella* Kentucky isolates in Tunisia / Y. Turki, I. Mehri, I. Fhoula, H.I. Ouzari, I. Fhoula // World J. Microbiol. Biotechnol. - 2014. - V. 30, No 1. - P. 87-98.

5. Rumore J.L. The impact of multilocus variable-number tandem-repeat analysis on PulseNet Canada *Escherichia coli* O157:H7 laboratory surveillance and outbreak support, 2008-2012 / J.L. Rumore, L. Tschetter, C. Nadon // Foodborne Pathog. Dis. - 2016. - V. 13, No 5. - P. 255-261.

6. Meisel S. Raman spectroscopy as a potential tool for detection of *Brucella* spp. in milk / S. Meisel, S. Stöckel, M. Elschner, F. Melzer, P. Röscher, J. Poppra // Appl. Environ. Microbiol. - 2012. - V. 78, No 16. - P. 5575-5583.

7. Schürch A.C. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches / A.C. Schürch, S. Arredondo-Alonso, R.J. L. Willems, R.V. Goering // Clin. Microbiol. Infect. - 2018. - V. 24, No 4. - P. 350-354.

8. Джавадов Э.Д. Дезинфекция – важный фактор обеспечения биобезопасности птицеводческих хозяйств / Э.Д. Джавадов, О.Ф. Хохлачев, О.Б. Новикова // БИО. - 2020. - № 10. - С. 20-25.

9. Терлецкий В.П. Эффективный метод генетической паспортизации штаммов *Bacillus subtilis* – перспективных продуцентов биопрепаратов / В.П. Терлецкий, В.И. Тыщенко, И.И. Новикова, И.В. Бойкова, С.Д. Тюлебаев, И.Я. Шахтамиров // Микробиология. - 2016. - Т. 85. - №1. - С. 50-55.

10. Terletski V. Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Choleraesuis, Typhimurium, Dublin and laboratory strains of *Escherichia coli* using subtracted restriction fingerprinting (SRF) / V. Terletski, S. Schwarz, J. Carnwath, H. Niemann // Microbiol. Res. - 2003. - V. 158, No 2. - P. 135-142.

11. Aires-de-Sousa M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview // Clin. Microbiol. Infect. - 2017. - V. 23, No 6. - P. 373-380.

Для контакта с авторами:

Терлецкий Валерий Павлович
E-mail: valeriter@mail.ru
Тыщенко Валентина Ивановна
E-mail: tinatvi@mail.ru

Identification of Genetic Variants in Currently Circulating Animal Pathogens

Terletsky V.P., Tyshchenko V.I.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding - branch of the Federal Scientific Center for Animal Husbandry of Academician L.K. Ernst

Summary: *The circulation of pathogenic microorganisms in poultry results in the decreased productive performance and high mortality levels thus causing significant economic losses to large-scale poultry farms and small-sized enterprises as well. Currently latent infections caused by opportunistic microbial species are especially relevant. The knowledge on the mechanisms of transmission of these potentially pathogenic species, timely identification of bacterial strains including those with epizootic/epidemic potential, determination of the presence of genetic structures within the strains responsible for the drug resistance are necessary elements of modern disease prophylaxis in poultry. The aim of the study presented was to compare the effectiveness of two practically important methods of identification of bacterial strains of *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus*. The method based on double digestion and selective labeling of DNA fragments (DDSL) showed greater efficiency in comparison with phage typing which is based on the assessment of sensitivity of isolates to a panel of selected phages. The discrimination index calculated on the basis of the analysis of 28 *Salmonella* isolates was 0.96 for DDSL genotyping and 0.88 for phage typing; this difference indicated that the first method is more effective for the identification of bacterial strains.*

Keywords: *genotyping, strains, poultry, bacteria, pathogens.*