

Генотипирование изолятов *E. coli*, выращенных из биоматериала индеек

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

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

Новикова О.Б., кандидат ветеринарных наук, зав. отделом микробиологии

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства (ВНИВИП) – филиал ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН

Шинкаренко Л.А., кандидат сельскохозяйственных наук, зам. директора по научной работе

Селекционно-генетический центр «Северокавказская зональная опытная станция по птицеводству» (СГЦ «СКЗОСП») – филиал ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН

Аннотация: Рассматриваются вопросы циркулирования у птиц патогенных микроорганизмов, подчеркивается важность их генотипирования с целью определения путей распространения инфекции и идентификации источника. В экспериментальной части работы представлены данные по возможным комбинациям ферментов рестрикции для генотипирования изолятов *E. coli* методом двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ). Выбрана лучшая пара ферментов для генотипирования (*Xba*I/*Pst*I); эта пара ферментов имеет один и тот же оптимальный буфер; таким образом, ферменты совместимы между собой при проведении одновременного расщепления геномной ДНК бактерий. Приведены сведения по теоретическому моделированию генотипирования *in silico*. Показано генетическое разнообразие патогена (идентифицировано 17 штаммов у 22 изолятов из биоматериала индеек), обсуждаются недостатки генотипирования с использованием праймеров ERIC. Представленные данные свидетельствуют о перспективности метода ДРИМ при генотипировании изолятов *E. coli*.

Ключевые слова: патогены, генотипирование, бактериальные штаммы, изоляты, *E. coli*, индейки.

Введение. Периодические вспышки инфекционных заболеваний как вирусной, так и бактериальной природы подчеркивают актуальность исследований, направленных на быструю идентификацию патогена, как на видовом, так и на штаммовом уровнях. Последняя задача решается использованием методов генотипирования, позволяющих выявить тонкие генетические различия между микроорганизмами на уровне последовательностей ДНК в геноме. Идентификация бактериальных штаммов позволяет отличить эндемические случаи инфекционных заболеваний от эпидемических вспышек, характеризующихся генетически оди-

наковым штаммом у всех заболевших особей. Эти данные также используются для выявления путей распространения инфекции и определения ее первичного очага (резервуара) во внешней среде [1-3]. Если все детектируемые фрагменты ДНК на генетических профилях будут совпадать, делается заключение о перезаражении особей друг от друга. Сведения о путях распространения инфекции позволяют эффективнее спланировать ветеринарно-санитарные мероприятия, направленные на прерывание эпизоотической цепи.

В настоящее время используются различные методы генотипирования, имеющие как преимущества, так и недостатки. К таким

методам можно отнести пульс-гель электрофорез (ПГЭ), риботипирование, мультилокусное секвенирование (MLST) и др. [3-5].

В предыдущие годы нами был разработан и валидирован на большой выборке изолятов метод генотипирования, основанный на двойном расщеплении и избирательном мечении фрагментов геномной ДНК – ДРИМ. В настоящее время метод используется для генотипирования изолятов нескольких видов патогенов бактериальной природы, выращенных из биоматериала птиц. Целью настоящего исследования был подбор эндонуклеаз рестрикции, валидация и практическое использование данного метода для генотипиро-



Таблица 1. Список теоретически возможных эндонуклеаз рестрикции для генотипирования методом ДРИМ в качестве второго фермента, образующего либо тупые, либо 3'-выступающие концы у фрагментов ДНК

Фермент	Число сайтов в геноме <i>E. coli</i>	Оптимальный буфер	Эффективность в буфере O (%)	Эффективность лигирования (%)
<i>Eco321</i>	2440	R	50-100	95
<i>Eco47III</i>	902	R	50-100	95
<i>DraI</i>	2017	Tango™	20-50	95
<i>PvuI</i>	1463	R	50-100	90
<i>PvuII</i>	2087	G	20-50	90
<i>MphI 101</i>	1073	R	20-50	95
<i>PstI</i>	1349	O	100	95
<i>BsuRI</i>	1300	R	100	95

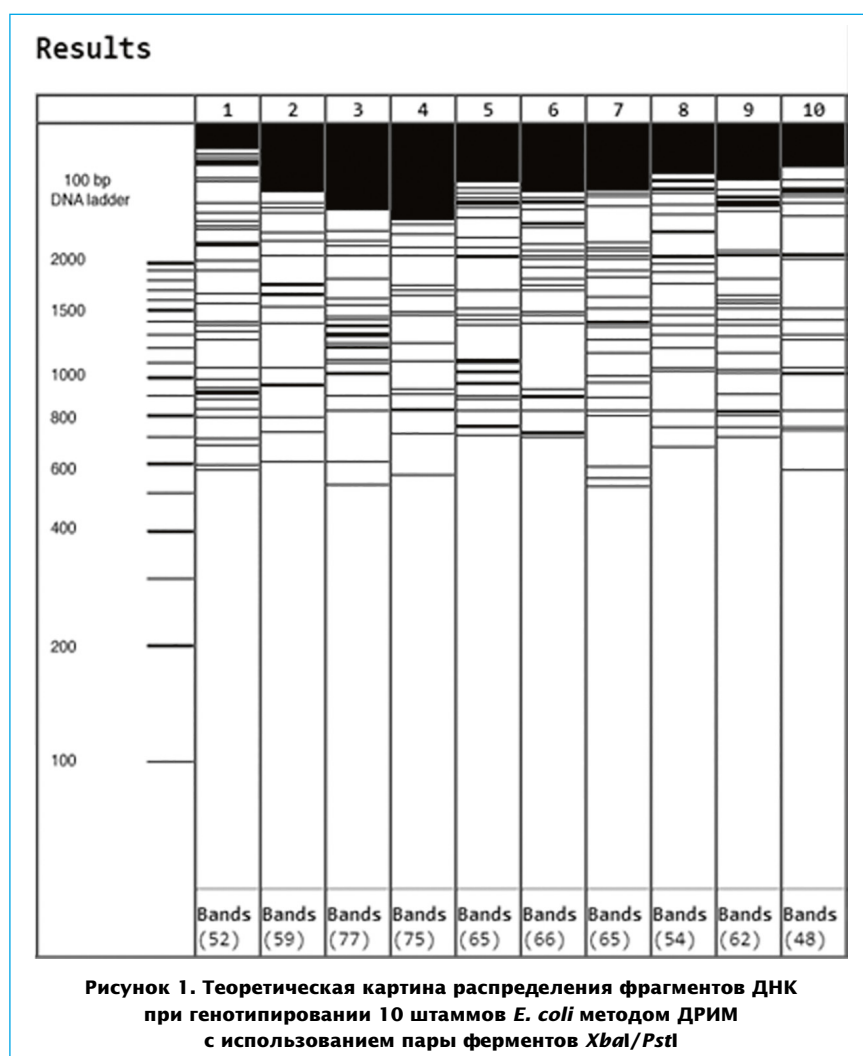


Рисунок 1. Теоретическая картина распределения фрагментов ДНК при генотипировании 10 штаммов *E. coli* методом ДРИМ с использованием пары ферментов *XbaI/PstI*

На первом этапе проводили подбор эндонуклеаз рестрикции для генотипирования. Результатом генотипирования методом ДРИМ является группа фрагментов ДНК в виде полос на фильтре, число и распределение которых специфично для каждого штамма. Полученные фрагменты ДНК разделяли по размеру электрофорезом в обычном 0,8% агарозном геле при напряжении 60 В в течение 12-16 ч. Длительный электрофорез необходим для точного разделения близких по размеру фрагментов ДНК. По завершении электрофореза ДНК переносили на нейлоновый фильтр, который подсушивали и облучали ультрафиолетовым светом в течение 4 мин для фиксации ДНК. После этого фрагменты ДНК на фильтре визуализировали в цветной реакции с применением конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза и двух цветных красителей – NBT и BCIP. Анализ количества и распределения фрагментов ДНК проводили визуально с учетом положения маркерной ДНК, в качестве которой использовали фрагменты ДНК фага лямбда.

Кроме генотипирования методом ДРИМ, провели амплифика-

вания изолятов кишечной палочки (*E. coli*), выделенных из биоматериалов от индеек.

Материал и методика исследований. Биоматериал от индеек был получен из СГЦ «СКЗОСП»

(Ставропольский край). Выращивание микроорганизмов (всего 22 изолята) в элективной, селективной и дифференциально-диагностической средах производили во ВНИВИП.

Таблица 2. Результаты генотипирования изолятов *E. coli*, выделенных из различных органов индеек, с использованием пары ферментов *XbaI/PstI*

Номера генотипов	Номера идентичных изолятов	Номера генетически близких изолятов
1	1 я	–
2	2 сл	–
3	3 д	–
4	4 ж	–
5	5 с, 6 п	–
6	7 с, 8 ж	–
7	–	9 д (близок 7 с, 8 ж)
8	10 т	–
9	11 сл, 12 д	–
10	14 сл, 15 сп	–
11	16 сп	–
12	17 сп	–
13	18 сп	–
14	19 сп	–
15	20 сп	–
16	21 пом	–
17	22 пом	–

Примечание: с – сердце, п – печень, ж – желчь, д – двенадцатиперстная кишка, сл – слепой отросток, сп – сперма индюков, т – тощая кишка, пом – помет, я – яйца индеек.

цию ДНК с использованием двух универсальных праймеров ERIC, используемых для идентификации разных видов энтеропатогенных бактерий, которые имеют гомологию к повторяющимся последовательностям в геномах:

ERIC прямой: ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C

ERIC обратный: AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G

Условия ПЦР для ERIC-праймеров: 94°C – 3 мин., затем 35 циклов: 94°C – 30 сек., 40°C – 30 сек., 72°C – 30 сек., в конце 72°C – 5 мин.

Результаты исследований и их обсуждение. В качестве первого фермента, который образует при расщеплении ДНК фрагменты с 3'-усеченными концами, которые могут включать меченый биотином дезоксицитозинтрифосфат (Bio-dCTP), был предложен фермент *XbaI* (оптимальный реакционный буфер

«O», Сибэнзим). Число сайтов рестрикции для этого фермента небольшое (20-40 у разных штаммов *E. coli*), что является оптимальным числом для последующей детекции. Поиск *in silico* позволил подобрать также группу ферментов, производящих тупые или 3'-выступающие концы, не включающие метку (табл. 1).

Данные ферменты, расщепляя ДНК, укорачивают длинные продукты, получаемые при расщеплении первым ферментом, что делает их оптимальными по размеру для разделения в агарозном геле. Анализ всех свойств ферментов позволил выбрать оптимальную эндонуклеазу, которая полностью совместима с реакционным буфером для первого фермента. Такой эндонуклеазой оказалась *PstI*, имеющая эффективность 100% в буфере «O».

Предварительные опыты показали преимущество комбинации ферментов *XbaI/PstI* при генотипировании изолятов кишечной палочки. Используя программу *in silico* (<http://insilico.ehu.eus>), которая имеет опцию для проведения моделирования ДРИМ-эксперимента (опция DDSL), можно генерировать фрагменты ДНК, ожидаемые при использовании отобранных ферментов. В отношении пары ферментов *XbaI/PstI* для 10 штаммов кишечной палочки программа рассчитывает количество теоретически ожидаемых фрагментов, их размер и распределение на фильтре. На рис. 1 представлен фрагмент такого рисунка.

Далее было проведено ДРИМ-генотипирование на реальных изолятах *E. coli*, выделенных от

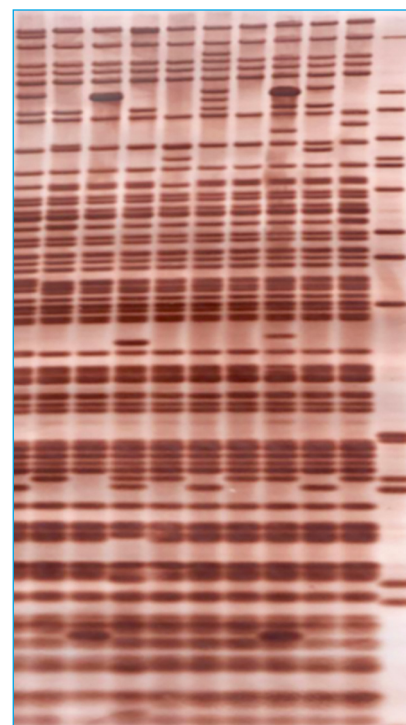


Рисунок 2. Генотипирование 10 изолятов *E. coli* методом ДРИМ с использованием пары эндонуклеаз рестрикции *XbaI/PstI* (фрагмент фильтра). Справа – дорожка с маркерной ДНК. Размеры маркера от 23130 п.о. (вверху) до 1361 п.о. (внизу)





больных и павших индеек, с использованием комбинации ферментов *XbaI/PstI* (рис. 2). Выявлен заметно отличающийся от остальных генотип, (рис. 2, дорожка 6 слева), который имел несколько фрагментов ДНК в других положениях на фильтре, по сравнению с положением фрагментов у всех остальных изолятов. Очевидно, данный штамм генетически существенно отличается от остальных. Всего в 22 изолятах было выявлено 17 различных генотипов, во многих случаях генотипы отличались по 2-3 фрагментам ДНК, в отдельных случаях фиксировали отличия всего по одному фрагменту, что говорит о высокой генетической близости этих штаммов (табл. 2).

Генотипирование тех же изолятов методом ПЦР с использованием пары праймеров ERIC показало низкую дискриминационную способность метода: 22 изолята распределились всего в 4 генотипа, что явно недостаточно для использования данных в молекулярной эпизоотологии при выяснении путей передачи возбудителя.

Заключение. Таким образом, генотипирование *E. coli* методом ДРИМ позволяет оценить разнообразие бактерии, циркулирующей у птиц, определить пути передачи возбудителя, доказать возможность колонизации разных органов одной особи.

Работа выполнена в рамках госзаданий №0599-2019-0025 (ВНИВИП) и №0599-2019-0040 (СГЦ «СКЗОСП»).

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 микробиологии, эпидемиологии

и иммунобиологии. - 2011. - №4. - С. 28-36.

4. 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.

5. Apostolakis I. Occurrence of colibacillosis in broilers and its relationship with avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) population structure and molecular characteristics / I. Apostolakis, A. Laconi, L. Mughini-Gras, Ö.Ş. Yapiciier, A. Piccirillo // Front. Vet. Sci. - 2021. - V. 8. - P. 737720.

Для контакта с авторами:

Терлецкий Валерий Павлович

E-mail: valeriter@mail.ru

Тыщенко

Валентина Ивановна

E-mail: tinatvi@mail.ru

Новикова Оксана Борисовна

E-mail: ksuvet@mail.ru

Шинкаренко

Лидия Александровна

E-mail: skzosp@yandex.ru

Fingerprinting of the *E. coli* Genotypes Isolated from Turkeys

Terletskiy V.P., Tyshchenko V.I., Novikova O.B., Shinkarenko L.A.

Federal Scientific Center «All-Russian Research and Technological Institute of Poultry» of Russian Academy of Sciences

Summary: The circulation of pathogenic microorganisms in poultry and the importance of their genotyping to determine the routes of their transmission and identification and elimination of their source are discussed. Possible combinations of restrictase enzymes for fingerprinting of pathogens by the method of double digestion selective label (DDSL) were experimentally tested. The pair of the restrictases *XbaI/PstI* was selected as the best for fingerprinting of *E. coli* isolates due to the common optimal buffer providing the compatibility of the enzymes and simultaneity of the restriction digestion of bacterial genomic DNA. Information on the in silico theoretical modeling of fingerprinting is presented. The method revealed high genetic diversity of the pathogen: 17 genotypes were identified in 22 isolates while the genotyping of these isolates by PCR with ERIC primers revealed only 4 genotypes. The data indicate that the DDSL technique is highly sensitive and promising for the fingerprinting of *E. coli* isolates.

Keywords: pathogens, fingerprinting, bacterial strains, isolates, *E. coli*, turkey.