

А.Н. Коломеец^{1,2}, С.Н. Шпынов^{1,2}, Н.В. Рудаков^{1,2}, И.Е. Самойленко¹, Т.А. Решетникова¹,
Л.В. Кумпан²

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
(ПЦР-ПДРФ) ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РИККЕТСИЙ ГРУППЫ КЛЕЩЕВОЙ ПЯТНИСТОЙ
ЛИХОРАДКИ**

¹Омский НИИ природно-очаговых инфекций (Омск)

²Омская государственная медицинская академия (Омск)

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированного в ПЦР гена в 590 п.о., кодирующего поверхностный белок *rOmpA*, использовался для генотипирования семи штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки. Эти штаммы были изолированы на территории России и Казахстана из различных видов клещей в период 1981–2000 гг. ПЦР-фрагменты разрезались рестрикционными эндонуклеазами *PstI* и *RsaI*, и эти образцы анализировались с помощью 1% агарозного гель-электрофореза и сравнивались с профилями известных видов риккетсий группы КПА. Комбинация профилей, полученных после рестрикции ПЦР-продуктов дала возможность осуществить дифференциацию риккетсий двух групп (*R. sibirica* subsp. *sibirica* – *R. sibirica* subsp. *BJ-90* и *R. sp. RpA4* – *R. sp. DnS14* – *R. sp. DnS28*).

Ключевые слова: риккетсии, группа пятнистой лихорадки, полимеразная цепная реакция, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

**THE USE OF COMPLEX OF MOLECULAR-GENETIC METHODS (PCR-RFLP) TO STUDY
OF SPOTTED FEVER GROUP RICKETTSIA**

A.N. Kolomeets^{1,2}, S.N. Shpynov^{1,2}, N.V. Rudakov^{1,2}, I.E. Samoilenko¹,
T.A. Reschetnikova^{1,2}, L.V. Kumpan²

¹Research Institute of Endemic Infectious Diseases, Omsk

²Omsk State Medical Academy, Omsk

Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 590-bp gene fragment coding for the surface protein *rOmpA* was used for genotyping of 6 strains of spotted fever group (SFG) rickettsiae. These strains were isolated on the territory of Russia and Kazakhstan from differed species of ticks during 1984–2000s. The PCR-fragments were cleaved with restriction endonucleases *PstI* and *RsaI*, and the digestion patterns were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and compared with profiles of known species of SFG rickettsiae. The combination of the profiles obtained after digestion of the PCR product allowed for the differentiation of 2 groups' rickettsiae (*R. sibirica* subsp. *sibirica* – *R. sibirica* subsp. *BJ-90* and *R. sp. RpA4* – *R. sp. DnS14* – *R. sp. DnS28*).

Key words: rickettsiae, spotted fever group, polymerase chain reaction, restriction endonuclease fragment length polymorphism analysis

В последние годы для идентификации новых изолятов риккетсий широко используются методы генетического типирования [1, 11, 12]. Наиболее точным методом молекулярной идентификации является секвенирование амплифицированного фрагмента ДНК и сравнение его с соответствующими последовательностями известных видов [10]. Этот метод не лишен недостатков, на что указывают некоторые авторы [6]. На практике чаще используются менее трудоемкие и дорогостоящие методы, одним из которых является ПЦР – ПДРФ. В ПЦР с помощью специфических праймеров амплифицируется фрагмент гена-мишени. С помощью эндонуклеаз рестрикции изучаемый фрагмент гена разрезается. После проведения электрофореза изучаются электрофоретические профили. Дальнейший анализ индивидуальных электрофоретических профилей позволяет осуществить молекулярно-биологическую идентификацию. При оптимальном выборе праймеров и рестриктаз этот метод характеризуется высокой раз-

решающей способностью и имеет хорошую воспроизводимость [6].

В последние годы, на фоне непрекращающегося роста заболеваемости клещевым риккетсиозом преимущественно за счет Западной Сибири и Дальнего Востока [7], расширилось представление о циркуляции представителей порядка *Rickettsiales* в иксодовых клещах в РФ [3, 10]. Кроме известных ранее *Rickettsia sibirica* (*R. sibirica*), *R. conorii* sp. *caspii*, впервые с помощью молекулярно-биологических методов выявлены: *R. slovacica*, *R. heilongjiangensis*, а также описаны впервые: *R. sp. RpA4*, *R. sp. DnS14*, *R. sp. DnS28* (геноварианты, образующие один кластер в геногруппе *R. massiliae*) и *Candidatus R. tarasevichiae* [4, 8, 9, 10]. Данные о работах по применению комплекса методов ПЦР – ПДРФ для идентификации новых видов риккетсий отсутствуют, что заставило нас изучить возможность применения этого подхода для дифференциации клещевых видов риккетсий, циркулирующих в Азиатской части России. Актуальность этого подхода обусловлена не-

достаточной видоспецифичностью серологической диагностики клещевых риккетсиозов, вследствие перекрестных реакций из-за выраженного антигенного сходства и низкого уровня межвидовой дифференциации, обусловленного недавней дивергенцией риккетсий группы КПА [2, 5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы штаммы: *R. sibirica subsp. VJ-90* («Приморье 32/84»), *R. sibirica subsp. sibirica* («Баево 107/87»), *R. sp. DnS14* («Шайман»), *R. sp. DnS28* («Бурятия-5»), *R. sp. RpA4* («Караганда 8/9»), *R. sp. RpA4* («Подгородка 5/6»).

Все штаммы были выделены сотрудниками Омского НИИ природно-очаговых инфекций из клещей в очагах клещевого риккетсиоза и на эндемичных по этой инфекции территориях РФ и республики Казахстан в период 1984 – 2000 гг. и хранились в лиофилизированном состоянии (табл. 1).

Выделение ДНК. Выделение ДНК из лиофилизированного штамма проводили фенол-хлороформным методом без сорбента. К осадку добавляли 200 мкл лизирующего буфера с гуанидином, вортексировали и инкубировали 1 час при + 56°. Затем добавляли 200 мкл фенол-хлороформной смеси. Вортексировали и инкубировали 30 минут при – 20°. После инкубации центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 5 минут. Верхняя фаза (200 мкл) отбиралась в новую пробирку, куда добавляли 20 мкл 3М ацетата натрия и 600 мкл 70 % этанола. Вортексировали и инкубировали 1 час при – 20°. После инкуба-

ции проводилось центрифугирование в течение 1 минуты при 12 000 об/мин. Полученный осадок отмывался в 500 мкл 70 %, а затем 96 % этанола. Высушенный осадок ресуспендировался в ТЕ-буфере.

Проведение ПЦР. В данной работе использовались специфические праймеры, амплифицирующие фрагмент гена в 590 пар оснований, кодирующего поверхностный белок OmpA риккетсий группы КПА: 190.70b (5'-ATG-GCG-AAT-ATT-TCT-CCA-AAA'-3') и 190.701b (5'-GTT-CCG-TTA-ATG-GCA-GCA-TCT'-3')

Для приготовления реакционной смеси использовался набор для ПЦР ООО «Лаборатория Медиген». Амплификация проводилась в термоджеле «Терцик».

Режим амплификации представлен в таблице 2.

Продукты амплификации подвергались воздействию эндонуклеаз рестрикции RsaI и PstI («СибЭнЗайм») путем добавления к полученному ампликону 1,0 мкл RsaI (сайт узнавания GT[^]AC) в 2,0 мкл буфера для RsaI, 0,5 мкл PstI (сайт узнавания CTGCA[^]G) в 2,5 мкл буфера для PstI. Инкубация проводилась при + 37° в течение 3 часов. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводилось в 0,7% агарозном геле в трис-ацетатном буфере (рН 8,9) в течение 40 минут.

Полученные результаты суммированы в таблице 3 и иллюстрированы примерами (рис. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Амплифицированные фрагменты ДНК *R. sibirica subsp. sibirica* и *R. sibirica subsp. VJ-90* раз-

Таблица 1

Использованные в работе штаммы

Штамм	Источник	Пассажная история	Вид риккетсии	Музей
Приморье 32/84	<i>D. silvarum</i>	морская свинка	<i>R. sibirica subsp. VJ-90</i>	Омский НИИПИ
Баево 107/87	<i>D. marginatus</i>	морская свинка	<i>R. sibirica subsp. sibirica</i>	-/-
Шайман	<i>D. silvarum</i>	клещевая экспериментальная модель	<i>Rickettsia sp. DnS14</i>	Всероссийский музей риккетсиозных культур НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН
Бурятия-5	<i>D. silvarum</i>	клещевая экспериментальная модель	<i>Rickettsia sp. DnS28</i>	-/-
Караганда 8/9	<i>D. marginatus</i>	клещевая экспериментальная модель	<i>Rickettsia sp. RpA4</i>	-/-
Подгородка 5/6	<i>D. marginatus</i>	клещевая экспериментальная модель	<i>Rickettsia sp. RpA4</i>	-/-

Таблица 2

Программа амплификации

Температура, С°	Время	Число циклов
94	3	1
94	30 сек.	44
54	30 сек.	
68	90 сек.	
68	7 мин.	1
4	∞	-

Результаты ПЦР-ПДРФ

Штамм и вид	Количество фрагментов RsaI	Количество фрагментов PstI
<i>R. sibirica subsp. sibirica</i> «Баево 107/87»	3	2
<i>R. sibirica subsp. BJ-90</i> «Приморье 32/84»	3	2
<i>Rickettsia sp.</i> DnS14 «Шайман» 2000 г.	2	2
<i>Rickettsia sp.</i> DnS28 «Бурятия-5» 2000 г.	2	2
<i>Rickettsia sp.</i> RpA4 «Караганда 8/9» 1998 г.	2	2
<i>Rickettsia sp.</i> RpA4 «Караганда 5/6» 1998 г.	2	2

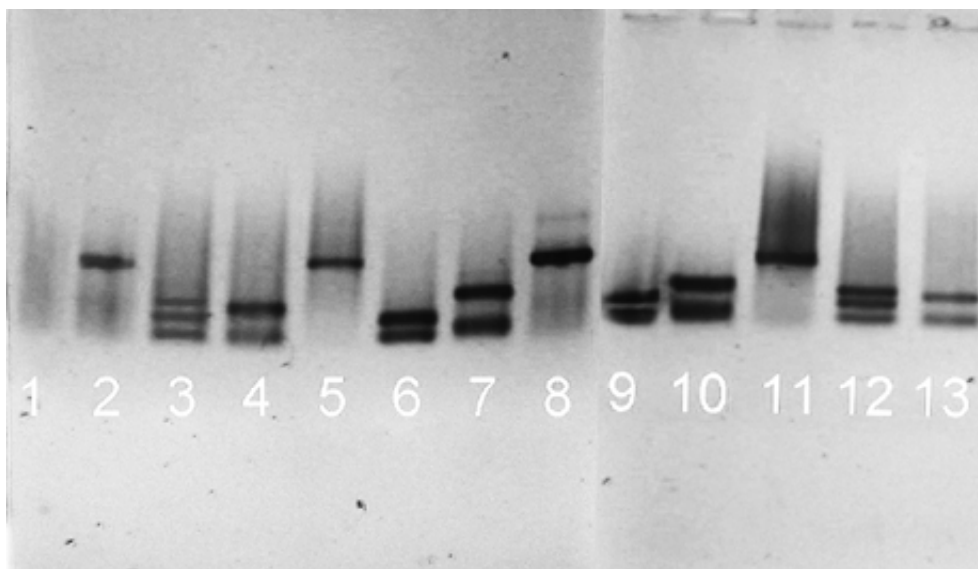


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК штаммов, гидролизованых рестриктазами RsaI и PstI.

резались на 3 фрагмента после обработки эндонуклеазой RsaI, с одинаковыми профилями в электрофореграмме. Эти же ампликоны разрезались на 2 фрагмента при обработке рестриктазой PstI, также со схожими у *R. sibirica subsp. sibirica* и *R. sibirica subsp. BJ-90* электрофоретическими профилями.

При обработке штаммов *R. sp.* DnS14 и *R. sp.* DnS28 рестриктазой RsaI получено 2 фрагмента, такое же количество получено после обработки ампликонов рестриктазой PstI. Штаммы *R. sp.* RpA4 имели сходную картину рестрикции по количеству и подвижности фрагментов со штаммами *R. sp.* DnS14 и *R. sp.* DnS28.

Все полученные картины рестрикции после обработки эндонуклеазами, принимая во внимание количество фрагментов и их электрофоретическую подвижность, можно объединить в две группы, включающие в себя:

1. *R. sibirica subsp. sibirica* и *R. sibirica subsp. BJ-90*.

2. *R. sp.* DnS14, *R. sp.* DnS28, *R. sp.* RpA4 геноварианты (образующие один кластер в геногруппе *R. massiliae*).

Применение данных эндонуклеаз рестрикции, с нашей точки зрения, является достаточным для дифференциации такого типа. Данный подход позволяет четко осуществить дифференциацию

R. sibirica subsp. sibirica и *R. sibirica subsp. BJ-90* от геновариантов *R. sp.* DnS14, *R. sp.* DnS28, *R. sp.* RpA4 в переносчиках на эндемичных и неэндемичных по клещевому риккетсиозу территориях.

Применение этого подхода актуально в связи с выявлением «новых» апатогенных риккетсий в клещах в очагах клещевого риккетсиоза. Необходимо его апробация для идентификации риккетсий группы КПЛ в переносчиках — иксодовых клещах, собранных на эндемичных и неэндемичных по этой инфекции территориях, а также в снятых с людей клещах и материале от пациентов для установления этиологической структуры риккетсиозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаева Н.М. Подходы к молекулярной эпидемиологии риккетсиозов / Н.М. Балаева // Журн. микробиол. — 1991. — № 1. — С. 72–75.
2. Генотипическая характеристика штаммов *Rickettsia sibirica* / Н.М. Балаева [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 1993. — № 4. — С. 15–18.
3. Методологические подходы применения молекулярно-генетических методов в изучении риккетсий и других протеобактерий / С.Н. Шпынов [и др.] // Современные технологии в диагнос-

тике особо опасных инфекционных болезней: Материалы 4 Межгосударственной науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. — Саратов, 2003. — С. 202—205.

4. Первое выявление *Rickettsia heilongjiangensis* в клещах *Haemaphysalis concinna* на территории России / С.Н. Шпынов [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. — 2003. — № 12. — С. 16—20.

5. Рудаков Н.В. Классификация и основные характеристики риккетсий / Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, И.Е. Самойленко // Актуальные проблемы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения: Материалы 4 межрегион. науч.-практ. конф. — Омск, 2003. — Т. 1. — С. 152—161.

6. Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций / И.А. Шагинян // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2000. — Т. 2, № 3. — http://www.antibiotic.ru/cmasc/2000_2_3/082.htm. — [4.04.2007].

7. Шпынов С.Н. Современное состояние очагов клещевого риккетсиоза в Российской Федерации / С.Н. Шпынов, Н.В. Рудаков // ЗНиСО. — 2004. — № 10 (139). — С. 36—39.

8. «*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*» in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Russia / S. Shpynov [et al.] // Ann. NY Acad. Sci. — 2003. — Vol. 990, June 2003. Rickettsiology: present and future directions. — P. 162—172.

9. Detection and Identification of Spotted Fever Group Rickettsiae in Dermacentor ticks from Russia and Central Kazakhstan / S. Shpynov [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Diseases. — 2001. — Vol. 20 (12). — P. 903—905.

10. New Rickettsiae in Ticks Collected in Territories of the Former Soviet Union / E. Rydkina [et al.] // Emerging Infectious Diseases. — 1999. — Vol. 5, № 6. — P. 811—814.

11. Proteinic and Genomic Identification of Spotted Fever Group Rickettsiae Isolated in the Former USSR / M.E. Ereemeeva [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. — 1993. — Vol. 31, № 10. — P. 2625—2633.

12. Roux V. Differentiation of Spotted Fever Group Rickettsiae by Sequencing and Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA of the Gene Encoding the Protein rOmpA / V. Roux, P.-E. Fournier, D. Raoult // Journal of Clinical Microbiology. — 1996. — Vol. 34, № 9. — P. 2058—2065.