

Эффективный метод идентификации штаммов *Escherichia coli*, выделенных из различных органов домашней птицы (*Gallus gallus domesticus*)

В.П. Терлецкий^{1, 2}, В.И. Тыщенко^{1, 2}, О.Б. Новикова², Э.Д. Джавадов², И.Я. Шахтамиров³, Н.Л. Адаев⁴

¹ Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных Федерального агентства научных организаций, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

² Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства Федерального агентства научных организаций, Санкт-Петербург, Ломоносов, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Чеченский государственный университет Министерства науки и образования России, Грозный, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Грозненский район, пос. Гикало, Россия

Выяснение путей распространения инфекции и идентификация источников патогена являются актуальными проблемами в системе профилактических мероприятий, направленных на борьбу с инфекционными заболеваниями человека и животных. Быстрый и точный метод идентификации бактериальных штаммов (генотипирование) позволяет на научной основе планировать противоэпизоотические мероприятия. Несмотря на обилие методов генотипирования микроорганизмов, не существует унифицированного подхода, применимого к разным видам патогенов. В исследовании была поставлена цель – разработать метод генотипирования, позволяющий идентифицировать штаммы *E. coli*, циркулирующие у кур различных птицефабрик России. Метод основан на ранее выдвинутой нами идее двойного расщепления и избирательного мечения рестрикционных фрагментов ДНК (ДРИМ). Геномная ДНК микроорганизма расщепляется одновременно двумя ферментами рестрикции и метится биотинилированным дезоксицитозинтрифосфатом с помощью ДНК-полимеразы. Ферменты подбираются *in silico* для каждого вида микроорганизма таким образом, чтобы в результате получить ограниченное число меченых фрагментов ДНК, которые легко разделить в обычном агарозном геле. В ходе выполнения экспериментальной работы на изолятах *E. coli* были доказаны воспроизводимость метода и его высокая дискриминационная способность. Данный подход был реализован при генотипировании ряда других патогенных микроорганизмов. К числу преимуществ предлагаемого метода относятся быстрота выполнения анализа, доступность реактивов и приборов. Показаны передача возбудителя между курами в пределах одной птицефабрики и возможность присутствия в разных органах одной особи генетически близких штаммов *E. coli*. Для генотипирования подходят бактериальные изоляты кур, выделенные из любых органов, кроме желудочно-кишечного тракта. В кишечнике присутствуют эндогенные бактериальные штаммы *E. coli*, что затрудняет интерпретацию результатов генотипирования. В работе показана возможность использования метода ДРИМ на полевых изолятах *E. coli* для решения вопросов молекулярной эпизоотологии.

Ключевые слова: генотипирование; ферменты рестрикции; расщепление ДНК; мечение; молекулярная эпизоотология; *E. coli*.

Efficient method for identification of *Escherichia coli* strains isolated from various chicken (*Gallus gallus domesticus*) organs

V.P. Terletskiy^{1, 2}, V.I. Tyshchenko^{1, 2}, O.B. Novikova², E.D. Dzhabadov², I.Ya. Shakhtamirov³, N.L. Adaev⁴

¹ Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Federal Agency for Scientific Organizations, St.-Petersburg, Pushkin, Russia

² All-Russia Research Veterinary Institute of Poultry Science, Federal Agency for Scientific Organizations, St.-Petersburg, Lomonosov, Russia

³ Chechen State University, Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Grozny, Chechen Republic, Russia

⁴ Chechen Agricultural Research Institute, Federal Agency for Scientific Organizations, Gikalo Village, Grozny raion, Chechen Republic, Russia

Tracing of transmission routes and identification of pathogen sources are important issues in preventive measures aimed at controlling human and animal infectious diseases. A fast and accurate method for bacterial strain identification (genotyping) allows scientifically sound planning of preventive schemes. Despite the existence of numerous bacterium genotyping techniques, there is still room for developing a unified typing approach that would be applicable to a variety of bacterial species. The aim is to develop a genotyping method allowing identification of *E. coli* strains circulating at Russian chicken farms. The method is based on the earlier proposed idea of double digestion and selective labeling of DNA restriction fragments (DDSL). Bacterial genomic DNA is simultaneously digested with two restriction enzymes and labeled with biotinylated deoxynucleoside triphosphates with the presence of DNA polymerase. The enzymes are chosen *in silico* for each bacterial species so that a limited number of DNA fragments be generated for subsequent separation in conventional agarose gel. After implementation of the study with *E. coli* isolates, adequate reproducibility and high discriminatory power of the technique were demonstrated. This

approach was previously applied to genotyping other pathogenic bacterial species. The advantages of the proposed technique are the short turn-around time of analysis and easy availability of reagents and equipment. Transmission of a pathogen among chicken within one farm and existence of slightly different *E. coli* genotypes in various organs of the same individual were observed. Bacterial isolates obtained from any organ except the intestine were suitable for genotyping. Chicken intestine contains endogenous *E. coli* strains, which hamper the interpretation of genotyping data obtained for a set of isolates. Thus, our work demonstrates the potential of the DDSL method for genotyping field *E. coli* isolates in the context of molecular epizootology.

Key words: genotyping; restriction enzymes; DNA digestion; labeling; molecular epizootology; *E. coli*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Новикова О.Б., Джавадов Э.Д., Шахтамиров И.Я., Адаев Н.Л. Эффективный метод идентификации штаммов *Escherichia coli*, выделенных из различных органов домашней птицы (*Gallus gallus domesticus*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):270-276. DOI 10.18699/VJ15.034

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Terletskiy V.P., Tyshchenko V.I., Novikova O.B., Dzhabadov E.D., Shahtamirov I.Ya., Adaev N.L. Efficient method for identification of *Escherichia coli* strains isolated from various chicken (*Gallus gallus domesticus*) organs. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):270-276. DOI 10.18699/VJ15.034

В настоящее время циркулирование патогенных видов бактерий на птицефабриках России находится под жестким контролем ветеринарных служб. Очаги инфекции быстро локализуются, и устраняется опасность распространения инфекции. В то же время условно-патогенная микрофлора все чаще вызывает заболевания у животных. К наиболее часто встречающимся этиологическим факторам инфекционных заболеваний относят *Escherichia coli*, которая всегда является частью нормальной микрофлоры кишечника, но в определенных условиях возникают патогенные штаммы, наносящие экономический урон птицеводству (Борисенкова и др., 2012).

Актуальность исследований диктуется необходимостью быстро находить пути распространения, а также выявлять источники инфекции. Циркулирование возбудителей во внешней среде приводит к периодическим вспышкам заболеваний (Макаров, 2007; Добрина, 2011). Инфекционные заболевания, прежде всего колибактериоз, несут особую угрозу, так как на птицефабриках условия благоприятствуют передаче микроорганизмов между особями (скученность содержания, запыленность помещений и т. д.). Кроме того, биологические особенности домашних кур современных промышленных кроссов predispose к острому течению многих инфекционных заболеваний и существенному отходу птицы на птицефабриках и снижению рентабельности отрасли в целом. Использование современных методов генотипирования позволяет ответить на вопросы эпизоотологического плана, в частности, каким путем происходит передача возбудителя и где находится источник инфекции (Тапальский и др., 2005; van Belkum et al., 2007). Эти сведения необходимы для предотвращения новых вспышек заболевания. Для надежной идентификации и паспортизации таких штаммов необходимо применение современных методов генотипирования микроорганизмов (Terletski et al., 2003; Жебрун и др., 2011). Генотипирование позволяет присвоить мо-

лекулярно-генетический «штрихкод» каждому штамму, что крайне важно при использовании их на практике, при решении спорных вопросов и при хранении коллекций штаммов в лабораторных условиях. Помимо этого, есть вероятность того, что определенный фрагмент ДНК может быть сцеплен с важной биологической или хозяйственно полезной особенностью штамма, что позволит использовать его в качестве маркера данного свойства при изучении других потенциально полезных штаммов.

Генотипирование применяется также при определении эффективности вакцинопрофилактики при использовании живых вакцин (сравниваются генотипы выделенных изолятов бактерий у птицы с клиническими признаками заболевания с генотипом вакцинного штамма). Генотипирование изолятов *E. coli* широко используется для решения ряда эпизоотологических вопросов в птицеводстве (Higgins et al., 2007; Lyhs et al., 2012; Hussein et al., 2013).

Существует множество методов типирования микроорганизмов. В настоящее время доказано, что методы, основанные на полиморфизме геномной ДНК (генотипирование), являются наиболее чувствительными и воспроизводимыми (Lukinmaa et al., 2004; van Belkum, 2007). Сейчас одним из самых распространенных методов генотипирования является метод пульс-гель электрофореза. К недостаткам метода можно отнести длительность проведения анализа, достигающую нескольких дней (Mitani et al., 2005); низкую типизируемость в отношении штаммов, экспрессирующих эндогенные нуклеазы (Koort et al., 2002); недостаточный уровень дискриминации штаммов (Wilse et al., 2004). Метод мультилокусного секвенирования (MLST) обладает низкой дискриминационной способностью (Fahkr et al., 2005) и весьма дорогой (Foxman et al., 2005).

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. (Terletskiy et al., 2008; Terletskiy et al., 2010). Результатом генотипирования методом ДРИМ является группа фрагментов ДНК в виде полос на фильтре, распределение которых специфично для каждого штамма. Точность идентификации штаммов, рассчитываемая по индексу дискриминации (Hunter, Gaston, 1988), превышает точность текущего «золотого стандарта» генотипирования (пульс-гель электрофорез) и достигает для псевдомонад 0,98, сальмонелл – 0,96. В России метод начал применяться при паспортизации коммерческих штаммов-продуцентов биопрепаратов *Bacillus subtilis*.

В нашей работе была поставлена цель – использование идеи двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ) для разработки метода генотипирования *E. coli*, вызывающей заболевания у сельскохозяйственной птицы. Научная новизна предлагаемых исследований заключается в разработке методики генотипирования и ее оптимизации под данный вид патогена.

Материалы и методы

Материалом исследования служит чистая культура бактериальных изолятов *E. coli*, полученных из различных органов больных и павших кур породы Хайсекс коричневый (45 изолятов от 23 особей, 2012 и 2013 гг.) из 6 птицефабрик России и вивария ФГБНУ ВНИВИП (Санкт-Петербург – Ломоносов).

Высевы на мясопептонный бульон делали из отдельных колоний, выращенных в чашках Петри на твердой питательной среде. Источником микроорганизмов служили сердце, печень, легкие, селезенка, яичные фолликулы, двенадцатиперстная кишка и слепая кишка больных и павших кур.

Метод генотипирования (двойное расщепление и избирательное мечение, ДРИМ) основан на одновременном расщеплении геномной ДНК микроорганизма двумя эндонуклеазами рестрикции и избирательном мечении отдельных фрагментов ДНК с последующей их визуализацией (Terletskiy et al., 2008). Для каждого вида микроорганизма подбирается пара эндонуклеаз, дающих оптимальное число и распределение фрагментов ДНК и способных расщеплять ДНК в одном буфере (двойное расщепление). Поиск *in silico* позволил подобрать фермент рестрикции *XbaI* (SibEnzyme®), который можно использовать в качестве продуцента фрагментов ДНК с «липкими концами», которые могут включать метку «биотинилированный дезоксицитозинтрифосфат (Bio-14-dCTP, Invitrogen™)» в реакции достройки с помощью ДНК-полимеразы.

Теоретическую картину распределения фрагментов ДНК, получаемую при генотипировании методом ДРИМ, можно создать с помощью компьютерной программы, доступной на сайте <http://insilico.ehu.es/>. Необходимо выбрать опцию «DDSL», далее определить пару ферментов рестрикции для симуляции генотипирования. Эта программа позволяет теоретически оценить количество фрагментов ДНК и их распределение в агарозном геле. Естественно, реальное распределение фрагментов на полевых изолятах несколько отличается от картины, полу-

чаемой теоретически на референтном штамме из базы данных секвенированных бактериальных геномов.

В качестве второго фермента, необходимого для уменьшения размера фрагментов ДНК до оптимального при их разделении в агарозном геле, служила одна из рестриктаз – *Eco32I*, *Eco47III*, *DraI*, *PvuI*, *PvuII*, *Mph110I* (Thermo Fisher Scientific™) и *PstI* (SibEnzyme®) (табл. 1).

Эти ферменты отбирались *in silico* с учетом частоты расщепления геномной ДНК *E. coli* в пределах 800–2500 раз. Они производят тупые либо 3'-выступающие концы у фрагментов ДНК после рестрикции, которые не могут включать метку Bio-14-dCTP в ферментативной реакции с Taq-полимеразой (SibEnzyme®). Таким образом, в реакции ДРИМ образуется ограниченное число меченых фрагментов ДНК, которые впоследствии выявляются в виде полос на фильтре. Полимераза включает дезокси-нуклеозидтрифосфаты в растущую цепь ДНК в направлении 5' к 3'. Экзонуклеазная активность в обратном направлении выражена неизмеримо слабее, что позволяет широко использовать фермент для мечения ДНК в коммерческих наборах. В нашем случае при температуре всего 37 °C даже полимеризационная активность составляет всего 10 % от максимума, а экзонуклеазная активность не проявляется вовсе.

После испытания всех указанных рестриктаз был отобран оптимальный фермент *PstI*. Он хорошо расщепляет ДНК в буфере O, не чувствителен к метилированию геномной ДНК, не обладает «звездчатой» активностью, недорог и достаточно специфичен по критерию эффективности лигирования фрагментов ДНК после расщепления. Таким образом, в отношении *E. coli* оптимальным сочетанием является пара эндонуклеаз рестрикции *XbaI/PstI*, производящая около 40 фрагментов ДНК. Эти ферменты были использованы в дальнейших экспериментах. С учетом числа сайтов расщепления рестриктазами *XbaI* и *PstI*, средний размер меченых фрагментов ДНК составлял 2000 пар оснований. Такой размер являлся оптимальным с точки зрения разделения фрагментов ДНК электрофорезом в 0,8 %-м агарозном геле.

Реакция проводилась в одной микропробирке, куда последовательно вносили исследуемую ДНК, две эндонуклеазы рестрикции, Taq-полимеразу, Bio-14-dCTP. Общий объем смеси составлял 20 мкл. Инкубация проводилась в течение 1–2 ч при 37 °C. Затем полученные фрагменты ДНК разделяли по размеру электрофорезом в обычном 0,8 %-м агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Сразу же после электрофореза ДНК переносили на нейлоновый фильтр. Процесс длился 30–60 мин и проводился в дистиллированной воде на приборе вакуумного переноса VacuGene XL Vacuum Blotting System™ (Amersham Biosciences™). После этого фрагменты ДНК на фильтре визуализировали в цветной реакции с применением конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза (Streptavidin-AP, Bio-Rad™) для выявления активности щелочной фосфатазы. Данная цветная реакция основывалась на использовании двух коммерчески доступных красителей NBT и BCIP (Thermo Fisher Scientific™). После проявления фрагментов ДНК фильтр отмывали несколько раз в дистиллированной воде для удаления неспецифически связанных красителей. Заключительный этап работы – анализ распределения

Таблица 1. Ферменты рестрикции для уменьшения размера фрагментов ДНК в ферментативной реакции ДРИМ и их характеристики (все рестрикционные буфера производства Thermo Fisher Scientific™)

Фермент	Число сайтов в геноме <i>E. coli</i>	Оптимальный буфер	Эффективность в буфере O, %	Эффективность лигирования, %
<i>Eco32I</i>	2 440	R	50–100	95
<i>Eco47III</i>	902	R	50–100	95
<i>DraI</i>	2 017	Tango™	20–50	95
<i>PvuI</i>	1 463	R	50–100	90
<i>PvuII</i>	2 087	G	20–50	90
<i>Mph110I</i>	1 073	R	20–50	95
<i>PstI</i>	1 349	O	100	95

фрагментов ДНК для выявления идентичных, близкородственных и генетически далеких бактериальных генотипов (штаммов).

Результаты

После испытания различных рестриктаз была определена оптимальная комбинация для последующего использования в генетической паспортизации штаммов *E. coli* – *XbaI* и *PstI*. Метод генотипирования ДРИМ для кишечной палочки разрабатывали на примере 29 изолятов. Изоляты брали из различных органов больных и павших кур, которые ранее содержались на различных птичниках двух птицефабрик. Результаты генотипирования проявлялись в виде 30–40 четко различимых фрагментов ДНК в диапазоне 400–23 000 пар оснований (рисунок).

По результатам генотипирования в 2012 г. было выявлено 14 различных генотипов *E. coli*, включая близкородственные варианты. Изучение молекулярно-эпизоотологических вопросов на примере птицефабрик позволило выявить несколько групп идентичных бактериальных изолятов, имеющих одинаковый профиль всех фрагментов ДНК (генотип 1 – 12 изолятов; генотип 8 – 2 изолята, 21 и 22; генотип 9 – 3 изолята, 23, 25 и 26, генотип 10а – 2 изолята, 28 и 29). В отдельных случаях удалось выявить генетически близкородственные штаммы. Например, генотип 1 дополнительно имел варианты 1а и 1б (табл. 2).

Самой большой группой идентичных штаммов оказались изоляты из птицефабрики № 1 под номерами 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 и 14, которые были отнесены к генотипу 1. Все перечисленные 12 изолятов были получены из разных органов 4 кур, содержащихся в одном птичнике. Идентичность изолятов свидетельствует о возможном перезаражении разных кур друг от друга в пределах одного птичника. Изолят 15 (генотип 1а) был получен из двенадцатиперстной кишки той же особи, что и изоляты с 1 по 4 (другие органы, генотип 1). Различие в профилях составило всего 2–3 фрагмента ДНК. В данном случае можно говорить о возникновении мутации у бактерий, специализирующихся на размножении в разных органах курицы либо об инфицировании особи одновременно двумя штаммами. Нельзя исключать также происхождение изолята из эндогенной микрофлоры, обитающей в двенадцатиперстной кишке кур. Вероятность последних двух сценариев невелика, так как соответствующие изоляты отличались друг от друга незначительно, а эндогенный штамм должен быть совершенно другим. Изолят 5 (генотип 1б) был выделен из сердца второй особи птичника 1 и отличался на три фрагмента ДНК от генотипа 1.

Изучение молекулярно-эпизоотологических вопросов на примере птицефабрики № 2 (изоляты 19–29) позволило выявить три группы идентичных изолятов (табл. 2). Например, генотип 9 включал три изолята: 23, 25 и 26. Кроме того, изолят 24 был генетически близок (различия – всего 2 фрагмента ДНК) к этому генотипу, соответствующему бактериальному штамму было присвоено наименование 9а. Все вышеуказанные изоляты выделялись из кур одного птичника. Таким образом, в пределах птичника № 13 цир-



Фрагмент фильтра с генотипированными изолятами *E. coli*.

Дорожки 1–3 – генетически идентичные изоляты; 4, 5 – генетически близкие изоляты; 6, 7 – генетически уникальные изоляты.

Таблица 2. Генотипы кишечной палочки, выявленные методом ДРИМ у кур породы Хайсекс коричневый из птицефабрики № 1 (изоляты с 1 по 18) и птицефабрики № 2 (изоляты с 19 по 29) Центрального федерального округа России

Генотипы (штаммы)	Изоляты	Органы	Особь/птичник
1	1, 2, 3, 4	Сердце, печень, легкие, фолликулы	1/1
1	6, 7	Печень, фолликулы	2/1
1	8, 10, 11	Сердце, фолликулы, костный мозг	3/1
1	12, 13, 14	Сердце, печень, фолликулы	4/1
1a	15	Двенадцатиперстная кишка	1/1
16	5	Сердце	2/1
2	16	Слепая кишка	1/1
3	9	Печень	3/1
4	17	Двенадцатиперстная кишка	4/1
5	18	Слепая кишка	4/1
6	19	Сердце	5/4
7	20	Двенадцатиперстная кишка	5/4
8	21, 22	Сердце, печень	6/10
9	23, 25, 26	Сердце, сердце, легкие	7/13, 8/13, 8/13
9a	24	Печень	7/13
10	27	Сердце	9/19
10a	28, 29	Печень, фолликулы	9/19, 9/19

Таблица 3. Генотипирование изолятов кишечной палочки, полученной из разных органов птицы методом ДРИМ в 2013 г.

Генотип	Изоляты	Хозяйство/корпус	Орган птицы
1	1	1/22	Общая масса внутренних органов
2	2	1/22	
3	3	1/22	
4	4	1/22	
4	5	1/22	
5	6	1/23	
6	7	1/23	
7	8	2/–	
8	9	3/–	
9	10	4/8	
10	11	Виварий ВНИВИП	Сердце, особь 1
10	12	Виварий ВНИВИП	Печень, особь 1
10a	13	Виварий ВНИВИП	Сердце, особь 2
10a	14	Виварий ВНИВИП	Печень, особь 2
106	15	Виварий ВНИВИП	Культура
106	16	Виварий ВНИВИП	Культура

кулируют два генетически близких штамма кишечной палочки. Подобная картина отмечалась и у кур другого птичника – № 19. Идентифицировался генотип 10 и пара изолятов идентичных, генетически близких к генотипу 10 (изоляты 28 и 29).

Различающиеся на большое число фрагментов ДНК изоляты 17 (генотип 4) и 18 (генотип 5) были получе-

ны от одной особи птичника 1 из двенадцатиперстной и слепой кишки соответственно. Это свидетельствует об инфицировании кур из различных источников либо об эндогенном характере изолятов. То же наблюдали на примере изолятов 19 и 20 в птичнике 4. В целом результаты свидетельствуют о возможном перезаражении кур друг от друга в пределах одного птичника. С другой

стороны, полученные данные показывают отсутствие циркулирования одинаковых генотипов между двумя птицефабриками и даже между разными птичниками на территории одной птицефабрики. Штаммы 2, 3, 4, 5, 6 и 7 (изоляты 16, 9, 17, 18, 19 и 20 соответственно) встречались только один раз и генетически сильно отличались как друг от друга, так и от всех остальных штаммов. В пределах птицефабрики № 1 в одном птичнике циркулируют несколько штаммов, соответствующих генотипам 1, 1а, 1б, 2, 3, 4, 5.

Работа по генотипированию изолятов от кур четырех географически удаленных птицеводческих хозяйств и вивария ФГБНУ ВНИВИП была продолжена в 2013 г. (табл. 3). Была выявлена группа близкородственных изолятов из вивария ГНУ ВНИВИП (генотипы 10, 10а и 10б). Различия между генотипами составляли всего 1–3 фрагмента ДНК. В остальных случаях различия были значительно более выраженными и измерялись многими фрагментами. Изоляты 1–10 выделялись из общей массы внутренних органов кур, включая кишечник. В этом случае наличие эндогенной кишечной микрофлоры привело к выявлению самых различных генотипов. Таким образом, использование такого подхода неоправданно с точки зрения молекулярной эпизоотологии, так как не позволяет идентифицировать пути передачи возбудителя. Культуры, выращенные из отдельных органов больных и павших кур, таких как сердце и печень, гораздо больше подходят для этих целей. Не удивительно, что пары изолятов 11 и 12; 13 и 14, выделенные из разных органов одной особи, были идентичными (генотип 10, 10а соответственно). Таким образом, в этом эксперименте снова установлен факт наличия двух генетически идентичных штаммов *E. coli* в разных органах одной и той же особи, что говорит о генерализации инфекционного процесса. Изоляты 15 и 16, составляющие один генотип, 10б, представляли собой бактерии, происходящие из одной культуры, которой были заражены два цыпленка.

Обсуждение

При появлении любых несовпадений в распределении фрагментов ДНК у двух изучаемых изолятов можно утверждать, что они относятся к двум генетически различным микробным штаммам. С другой стороны, если два образца не различаются, то есть некоторая вероятность, что они все-таки различны, так как ни один метод генотипирования (кроме полногеномного секвенирования) не анализирует целый геном, а скринирует лишь отдельные его участки. Не исключено, что другие методы анализа могут в каких-то случаях выявить разницу. Однако данные, полученные на нескольких видах клинически значимых микроорганизмов (*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile*), указывают, что метод ДРИМ является самым высокочувствительным для выявления генетических различий между штаммами.

Метод ДРИМ основан на одновременном расщеплении геномной ДНК микроорганизма двумя рестрикционными эндонуклеазами и избирательном мечении отдельных фрагментов ДНК. Одна из рестриктаз при расщеплении ДНК образует ограниченное число фрагментов с так на-

зываемыми «липкими концами», которые включают метку Bio-14-dCTP. В то же время многочисленные фрагменты ДНК, образованные второй рестриктазой, не включают метку. Такая избирательность мечения позволяет уменьшить число фрагментов ДНК с нескольких тысяч до нескольких десятков и выявить это ограниченное число фрагментов на фильтре после их разделения по размеру в обычном агарозном геле. Преимуществом метода являются быстрота (одни сутки в сравнении с несколькими сутками при генотипировании пульс-гель-электрофорезом), 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 рассчитать 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>). Она была разработана исследователями из Испании (Bikandi et al., 2004), которые также участвовали в разработке метода ДРИМ для клинически важных видов патогенных бактерий в рамках совместных грантов НАТО. В настоящее время ДРИМ-генотипирование используется в клинических лабораториях зарубежных стран.

Возможные пути использования метода генотипирования методом ДРИМ:

генетическая идентификация/паспортизация штаммов различных видов микроорганизмов, используемых в практике и научной деятельности;

мониторинг способов распространения патогенов бактериальной природы (пути передачи, источники инфекции);

возможно выявление маркерных фрагментов ДНК, сцепленных с фенотипическими признаками микроорганизма.

Таким образом, разработанный метод генотипирования позволяет выявить пути распространения колибактериоза у кур в условиях птицефабрик. Его можно рекомендовать для решения вопросов эпизоотологии и эпизоотологии, генетической паспортизации бактериальных штаммов. Предложенный молекулярно-генетический метод носит универсальный характер, так как может быть адаптирован практически к любому микроорганизму.

Благодарности

Работа поддержана бюджетным финансированием по государственному заданию (этапу) 19.5 ФГБНУ ВНИИГРЖ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Борисенкова А.Н., Новикова О.Б., Оконеvский П. Флорфеникол в птицеводстве. Птицеводство. 2012;3:43–45.
- Добринa М.Н. Нужен постоянный контроль сальмонеллеза. Животноводство России. 2011;3:11–13.
- Жебрун А.Б., Мукомолов С.Л., Нарвская О.В. Генотипирование и молекулярное маркирование бактерий и вирусов в эпизоотическом надзоре за актуальными инфекциями. Журн. микробиологии, эпизоотологии и иммунобиологии. 2011;4:28–36.

- Макаров В.В. Истоки и эволюция современной эпизоотологии. Ветеринар. патология. 2007;3:8-17.
- Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Фенотипическое и молекулярно-генетическое типирование сальмонелл: реалии и перспективы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии. 2005;6:88-93.
- Bikandi J., San Millan R., Rementeria A., Garaizar J. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics*. 2004;20(5):798-799.
- Fakhr M.K., Nolan L.K., Logue C.M. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(5):2215-2219.
- Foxman B., Zhang L., Koopman J.S., Manning S.D., Marrs C.F. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiological studies. *Epidemiol. Perspect. Innov.* 2005;2(10). DOI: 10.1186/1742-5573-2-10
- Higgins J., Hohn C., Hornor S., Frana M., Denver M., Joeger R. Genotyping of *Escherichia coli* from environment and animal samples. *J. Microbiol. Methods*. 2007;70(2):227-235.
- 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;26(11):2465-2466.
- Hussein A.H., Ghanem I.A., Eid A.A., Ali M.A., Sherwood J.S., Li G., Nolan L.K., Logue C.M. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken flocks in Egypt. *Avian Dis.* 2013;57(3):602-611.
- Koort J.M.K., Lukinmaa S., Rantala M., Unkila E., Siitonen A. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(9):3497-3498.
- Lukinmaa S., Nakari U.-M., Eklund M., Siitonen A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *APMIS*. 2004;112(11/12):908-929.
- Lyhs U., Ikonen I., Pohjanvirta K., Raninen K., Perko-Mäkelä P., Pelkonen S. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in poultry meat products on the Finnish retail market. *Acta Vet. Scand.* 2012;54(64). DOI: 10.1186/1751-0147-54-64
- Mitani N., Koizumi A., Sano R., Masutani T., Murakawa K., Mikasa K., Okamoto Y. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP and its usefulness in an epidemiological study of an outbreak. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2005;58(4):250-252.
- Terletski V., Schwarz S., Carnwath J., Niemann H. Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Choleraesuis, Typhimurium, Dublin and laboratory strains of *Escherichia coli* using subtracted restriction fingerprinting (SRF). *Microbiol. Res.* 2003;158:135-142.
- 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;72(3):283-287.
- Terletskiy V., Tyshchenko V., Martinez-Ballesteros I., Garaizar J., Bikandi J. Validation of Double Digest Selective Label database for sequenced prokaryotic genomes. *Bioinformatics*. 2010;26(3):417-418.
- Van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N.K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M., Escmid E. Guidelines for the validation and application of typing methods for the use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007;13:Suppl.3:1-46.
- Willse A., Straub T.M., Wunschel S.C., Small J.A., Call D.R., Daly D.S., Chandler D.P. Quantitative oligonucleotide microarray fingerprinting of *Salmonella enterica* isolates. *Nucl. Acids Res.* 2004;32(5):1848-1856.