

ВОПРОСЫ ДИАГНОСТИКИ

Совершенствование генотипирования штаммов *B. pertussis*

Г. А. ИВАШИННИКОВА, О. Ю. БОРИСОВА, А. В. АЛЕШКИН, А. С. ПИМЕНОВА, В. А. АЛЕШКИН

ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва

Разработан новый ускоренный молекулярно-генетический способ типирования штаммов *B. pertussis* по структуре *ptxP* промотора коклюшного токсина. Метод основан на ПЦР-ПДРФ анализе, который позволяет получить характерный рестрикционный профиль и дает возможность дифференцировать штаммы с особенностями структуры промотора *ptxP*. Разработанный метод типирования штаммов *B. pertussis* может являться инструментом при мониторинге штаммов возбудителя коклюша в системе эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией, позволяющим проводить наблюдение за циркулирующей популяцией *B. pertussis*, выявлять высоковирулентные штаммы возбудителя коклюша и следить за их распространением.

Ключевые слова: *B. pertussis*, рестрикционный анализ, промотор коклюшного токсина

Modernization of genotyping of strains *B. pertussis*

G. A. Ivashinnikova, O. U. Borisova, A. V. Aleshkin, A. S. Pimenova, V. A. Aleshkin

Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky, Moscow

The new rapid molecular genotyping method was developed for studying the structure of *ptxP* promoter of pertussis toxin. Method is based on PCR-RFLP analysis, which allows studying the specific restriction profiles of the *B. pertussis* strains and allows differentiation of the strains with the *ptxP* structural particularities. The developed method for genotyping of strains of *B. pertussis* can be helpful when monitoring strains of the causative agent of whooping cough in system of an epidemiological surveillance over pertussis infections, allowing observation over circulating population of *B. pertussis*, revealing strains of the causative agent of whooping cough with high production of pertussis toxin and to watch their distribution.

Key words: *B. pertussis*, restriction analysis, pertussis toxin promoter

Контактная информация: Ивашинникова Галина Антоновна — мл. науч. сотр. лаборатории диагностики дифтерийной инфекции ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора; 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10; (495) 459-21-46; ivashinnikova@gmail.com.

УДК 616.921.8-07

Коклюш, несмотря на 50-летнюю успешную практику массовой иммунизации, остается актуальной проблемой для здравоохранения в различных странах мира. С 1990-х годов прошлого века во многих странах Европы и Америки, где регистрируется высокий уровень охвата профилактическими прививками, отмечается рост заболеваемости коклюшем [1–5]. В России, несмотря на очевидные успехи проводимой массовой иммунизации, до настоящего времени сохраняются подъемы и спады заболеваемости, как за счет привитых, так и непривитых, регистрируются тяжелые формы болезни, высокая заболеваемость детей раннего возраста, единичные летальные исходы и увеличилась заболеваемость детей школьного возраста [6–8]. Все это привело к усилению внимания к проблеме коклюша и разработке новых методов диагностики и мониторинга возбудителя.

Молекулярно-генетический мониторинг штаммов *B. pertussis*, проводимый во многих странах мира и в России, показал, что штаммы *B. pertussis* подвержены изменчивости, затрагивающей детерминанты, кодирующие не только основные факторы патогенности возбудителя, но и их регуляторные структуры, отвечающие за уровень их продукции [1–6, 9–14]. Было установлено, что штаммы с новыми «невакцинными» аллелями этих генов постепенно вытесняют штаммы со старыми «вакцинными» аллелями, т. е. происходит селекция штаммов с измененной структурой антигенных детерминант, которые отличаются по антигенной специфичности от структуры вакцинных штаммов, используемых для производства профилактических препаратов.

Одной из регуляторных структур, изменения в которой оказывают влияние на уровень экспрессии оперона *ptx* и продукцию самого коклюшного токсина, является про-

морная *ptxP* область коклюшного токсина [2–5, 9, 10]. В настоящее время единственным методом для определения особенностей структуры промотора *ptxP* является прямое секвенирование с последующим анализом нуклеотидной последовательности и выявлением точечных мутаций в двух положениях. Однако, данный метод является длительным, трудоемким, дорогостоящим и не может быть использован для ускоренного слежения за циркулирующими штаммами. Поэтому, большое значение на современном этапе развития эпидемического процесса коклюшной инфекции приобретает наблюдение за генетической структурой детерминант как основных факторов патогенности, так и за структурой регуляторных детерминант *B. pertussis*, и разработка новых ускоренных молекулярно-генетических методов мониторинга, позволяющих выявлять измененные клоны возбудителя, которые могут оказывать влияние на течение эпидемического и инфекционного процессов.

Цель исследования — разработка ускоренного молекулярно-генетического метода типирования штаммов *B. pertussis* по структуре промотора *ptxP* коклюшного токсина на основании ПЦР-ПДРФ анализа.

Материалы и методы исследования

В работе изучено 258 штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в Российской Федерации в 2000–2012 г.г., а также 84 штамма *B. pertussis*, выделенные в 1948–1999 г.г. (из коллекции ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора). Микробиологическое исследование штаммов *B. pertussis* проводили согласно Инструкции [15] путем изучения их морфологических, культуральных, тинкториальных и серологических свойств. Постановку ПЦР осуществляли согласно опубликованному

протоколу [4]. Секвенирование нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК штаммов *B. pertussis* определяли с помощью ABI PRISM Big Terminator cycling sequencing ready reaction kit на ABI DNA секвенаторе. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ BLAST и базы данных EMBL/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Результаты и их обсуждение

Для ускоренного слежения за циркулирующими штаммами *B. pertussis* и выявления эпидемически значимых штаммов возбудителя коклюша с повышенной продукцией коклюшного токсина нами разработан ускоренный молекулярно-генетический метод типирования штаммов *B. pertussis* по структуре промотора *ptxP* на основании ПЦР-ПДРФ анализа, который позволяет получить характерный рестрикционный профиль, являющийся генетическим «маркером», тесно связанным с генотипом микроорганизма. Ускоренный метод типирования штаммов *B. pertussis* включает в себя выделение ДНК штаммов *B. pertussis*, постановку ПЦР со специфическими праймерами PF и PR, дальнейшую последовательную обработку полученных ампликонов специфическими эндонуклеазами *KpnI* и *MluI* с последующим проведением электрофореза для разделения рестрицированных фрагментов и визуализацию результатов в ультрафиолетовом спектре.

В процессе изучения генетической структуры промотора *ptxP* коклюшного токсина у штаммов *B. pertussis* методом секвенирования выявлены 3 варианта последовательности нуклеотидов, которые полностью совпадали с данными EMBL/GeneBank и соответствовали 3 аллелям промотора *ptxP*. Так, для *ptxP1* и *ptxP3* аллелей в положении (-167) характерным является нуклеотид С, в то время как для *ptxP2* аллеля — нуклеотид Т. Во втором положении (-65) для аллелей *ptxP1* и *ptxP2* характерным является нуклеотид G, а для третьего варианта — нуклеотид А. Первый аллель промотора — *ptxP1*, согласно базе данных, является «вакцинным», *ptxP2* и *ptxP3* — новыми «невакцинными» аллелями. Показано, что новый «невакцинный» *ptxP3* аллель промотора имеет значимые мутационные изменения, затрагивающие функциональную область, отвечающую за связывание с *VvgA* димером, что приводит к усилению прочности связи, оказывающей влияние на экспрессию оперона *ptx* и, как следствие, увеличению продукции коклюшного токсина. При изучении штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в настоящее время, нами было установлено, что большинство штаммов имеют значимые мутационные изменения в структуре промотора *ptxP* и в опытах *in vivo* на мышах являются высоковирулентными [9, 10].

Поэтому, учитывая выявленные особенности структуры промотора *ptxP*, из большого спектра существующих эндонуклеаз выбраны две эндонуклеазы — *MluI* и *KpnI*, использование которых позволяет получить специфические рестрикционные профили для штаммов с тремя аллелями промотора *ptxP*. Последовательность нуклеотидов в положениях 313—318 *ptxP1* и *ptxP2* аллелей промотора коклюшного токсина создают сайт рестрикции для эндонуклеазы *KpnI* (5'-GGTACC-3'). Нуклеотидная последовательность *ptxP2* аллеля промотора в положениях 206—211 создает сайт рестрикции для эндонуклеазы *MluI* (5'-ACGCGT-3'). Диф-

ференциация штаммов, несущих *ptxP3* аллель промотора от штаммов несущих *ptxP2* и *ptxP1* аллели основана на отсутствии сайтов рестрикции для эндонуклеаз *MluI* и *KpnI* в нуклеотидной структуре *ptxP3* аллеля. В свою очередь, отсутствие сайтов рестрикции для эндонуклеазы *MluI* в нуклеотидной структуре *ptxP1* аллеля — создает возможность дифференциации штаммов, несущих *ptxP1* аллель промотора от штаммов несущих *ptxP2* аллель. Нуклеотидная структура *ptxP2* аллеля промотора в положениях 313—318 и 206—211 создает сайты рестрикции для эндонуклеаз *KpnI* и *MluI* соответственно. Дифференциацию штаммов проводят путем сравнения размеров полученных рестрикционных фрагментов с контрольными образцами ДНК, имеющими *ptxP1*, *ptxP2* и *ptxP3* аллели промотора коклюшного токсина.

После обработки ампликонов промотора *ptxP* эндонуклеазой рестрикции *KpnI* и постановки горизонтального электрофореза в агарозном геле, в ультрафиолетовом спектре выявляли 2 варианта рестрикционного профиля. Для одной группы штаммов был характерен рестрикционный профиль с наличием двух специфических светящихся фрагментов размером 315 и 217 п. н. (тип *KpnI-1*), что соответствовало размеру специфических светящихся фрагментов ДНК контрольных штаммов *B. pertussis*, несущих *ptxP1* и *ptxP2* аллели промотора КТ, для второй группы штаммов — наличие одного специфического светящегося фрагмента размером 532 п. н. (тип *KpnI-2*), что соответствовало размеру фрагмента ДНК контрольного штамма *B. pertussis*, несущего *ptxP3* аллель. Следовательно, после рестрикции с эндонуклеазой *KpnI* можно дифференцировать штаммы, несущие *ptxP1* и *ptxP2* аллели, от штаммов, несущих *ptxP3* аллель промотора КТ.

Для точной дифференциации штаммов, несущих *ptxP1* и *ptxP2* аллели промотора КТ, проводили обработку ампликонов эндонуклеазой рестрикции *MluI*. После проведения электрофореза в агарозном геле и визуализации результатов рестрикции в ультрафиолетовом спектре, выявили 2 группы штаммов, имеющие разный набор специфических светящихся фрагментов. Для первой группы характерным было наличие 2 специфических светящихся фрагментов размером 321 и 211 пар нуклеотидов (тип *MluI-1*), данный рестрикционный профиль совпадал с профилем контрольного образца ДНК штамма *B. pertussis*, несущего *ptxP2* аллель промотора КТ. Для второй группы штаммов характерным было наличие одного специфического светящегося фрагмента размером 532 пар нуклеотидов (тип *MluI-2*), что соответствовало профилю контрольных образцов ДНК штаммов возбудителя коклюша, несущих *ptxP1* и *ptxP3* аллели промотора. Следовательно, после рестрикции с эндонуклеазой *MluI* можно дифференцировать между собой штаммы, несущие *ptxP1* и *ptxP2* аллели промотора КТ.

Таким образом, для штаммов *B. pertussis*, несущих *ptxP1* аллель промотора КТ, характерно наличие рестрикционных профилей типов *KpnI-1* и *MluI-2*, для штаммов, несущих *ptxP2* аллель, — *KpnI-1* и *MluI-1*, для штаммов, несущих *ptxP3* аллель — профилей *KpnI-2* и *MluI-2*. Разница комбинаций рестрикционных профилей различных аллелей промотора КТ является способом быстрой дифференциации штаммов.

С использованием разработанного метода молекулярно-генетического типирования изучена генетическая структура промотора *ptxP* коклюшного токсина 342 штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в 1948–2012 гг. (из них 84 штамм выделен от больных коклюшем в 1948–1999 гг. и 258 штамм выделен от больных коклюшем в 2000–2012 гг.). Все штаммы были предварительно идентифицированы в бактериологическом методе и секвенированы фрагменты их промотора *ptxP*. В результате проведенного исследования выявлены особенности генетической структуры *ptxP* промотора и показано, что для 57 (24,6%) штаммов характерным был рестрикционный профиль типов *KpnI*-1 и *MluI*-2 и данные штаммы при секвенировании несли *ptxP1* аллель промотора; 24 (10,3%) штамма характеризовались рестрикционным профилем *KpnI*-1 и *MluI*-1 и имели *ptxP2* аллель и 151 (65,1%) штамм характеризовался рестрикционным профилем *KpnI*-2 и *MluI*-2 и несли *ptxP3* аллель промотора КТ. Следовательно, показана специфичность нового метода на основе ПЦР-ПДРФ, т. е. получено полное совпадение с результатами секвенирования промотора *ptxP*.

Выводы

1. Разработанный метод мониторинга штаммов *B. pertussis* по структуре *ptxP* промотора, на основе изучения полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированных продуктов (ПЦР-ПДРФ), дает возможность дифференцировать штаммы с особенностями структуры промотора *ptxP* и, как следствие, с увеличенной продукцией коклюшного токсина.

2. Разработанный метод типирования штаммов *B. pertussis* может являться инструментом при мониторинге штаммов возбудителя коклюша в системе эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией, позволяющим проводить наблюдение за циркулирующей популяцией *B. pertussis*, выявлять высоковирулентные штаммы возбудителя коклюша и следить за их распространением. На новый молекулярно-генетический метод типирования штаммов *B. pertussis*, имеющих различную структуру промотора *ptxP*, подан патент на изобретение.

Литература:

1. Analysis of Swedish *Bordetella pertussis* isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage / Advani A.,

- H.G.J. Van der Heide, H.O. Hallander, F.R. Mooi // *J. of Microbiological Methods*. — 2009. — V. 78. — P. 297 — 301.
2. Appearance of *fim3* and *ptxP3* —*Bordetella pertussis* strains in two regions of Sweden with different vaccination program / A. Advani et al // *Vaccine*. — 2011. — V. 29. — P. 3438 — 3442.
3. Selection and emergence of *ptxP3* allele in the evolution of *Bordetella pertussis* / C. Lam et al // *Infect. Genetic Evolution*. — 2012. — V. 12. — P. 492–495.
4. *Bordetella pertussis* with increased pertussis toxin production associated with pertussis resurgence / F.R. Mooi F. R. et al // *Emerg. Infect. Dis.* — 2009. — V. 15. — P. 1206–1213.
5. Polymorphism in the pertussis toxin promoter region affecting the DNA-based diagnosis of *Bordetella* infection / Nygren M., Reizenstein E., Ronaghi M., Lundeberg J. // *J. Clin. Microbiology* — 2000. — V. 38. — P. 55 — 60.
6. Особенности коклюшной инфекции в различные периоды эпидемического процесса в г. Москве / О.Ю. Борисова и др. // *Журнал эпидемиология и вакцинопрофилактика*. — 2010. — № 4. — С. 33 — 39.
7. Лыткина И.Н. Заболеваемость коклюшем в Москве и организация мероприятий по ее снижению / Лыткина И.Н., Г.Г. Чистякова, Н.Н. Филатов // *Новости вакцинопрофилактики: Вакцинация*. — 2004. — № 35. — С. 8–9.
8. Особенности эпидемического процесса коклюшной инфекции в Москве на современном этапе / Г.Г. Чистякова и др. // *ЖМЭИ*. — 2005. — № 5. — С. 35–40.
9. Особенности генотипической изменчивости штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в России / Алешкин В.А., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Мазурова И.К. // *Бюллетень ВШНЦ СО РАМН*. — 2012. — № 5 (87). — Ч. 1. — С. 177 — 183.
10. Генетическая характеристика штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных от больных коклюшем в России / О.Ю. Борисова и др. // *Медицинский альманах*. — 2012. — № 2 (21). — С. 30 — 34.
11. Динамика изменчивости основных генов патогенности штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в Москве (1948–2005 г. г.) / Мазурова И.К., Борисова О.Ю., Комбарова С.Ю., Гадуа Н.Т., Алешкин В.А. // *Молекулярная медицина*. — 2008. — № 1. — С. 40 — 45.
12. Семенов Б.Ф., Захарова Н.С., Мазурова И.К. Подъем заболеваемости коклюшем на фоне массовой вакцинации. Гипотезы, объясняющие этот феномен // *ЖМЭИ*. — 2003. — № 6. — С. 70–73.
13. Современные штаммы *Bordetella pertussis*: молекулярная и иммунобиологическая характеристика / А.С. Шинкарев и др. // *Журн. Микробиол.* — 2007. — № 4. — С. 20 — 25.
14. Antigenic divergence between *B. pertussis* clinical isolates from Moscow, Russia, and vaccine strains / O. Borisova et al // *J. Clin. And Vaccine Immunology*. — 2007. — № 28. — P. 234–238.
15. Министерство здравоохранения СССР. Инструкция по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракоклюше. — 1984. — 23 стр.

Шейная лимфаденопатия инфекционной этиологии у детей: вопросы дифференциальной диагностики

С. Ю. ТЕРЕЩЕНКО

ГБУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический Научный Центр» Минздравсоцразвития РФ

Шейная лимфаденопатия является очень частой диагностической находкой в практике педиатра. Большинство случаев увеличения лимфоузлов у детей не сопряжены с серьезными, угрожающими жизни заболеваниями. Однако у некоторой части паци-