

5. Alzamora R., O'Mahony F., Harvey B.J. Estrogen inhibits chloride secretion caused by cholera and Escherichia coli enterotoxins in female rat distal colon. *Steroids*. 2011, 76: 867-876.
6. Amasheh S., Meiri N., Gitter A.H. et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 2002, 115: 4969-4976.
7. Amasheh M., Schlichter S., Amasheh S. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 2008, 138 (6): 1067-1073.
8. Angelow S., Yu A. S. Claudins and paracellular transport: an update. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2007, 16 (5): 459-464.
9. Berkes J., Viswanathan V. K., Savkovic S. D., Hecht G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*. 2003, 52 (3): 439-451.
10. Furuse M., Hirase T., Itoh M. et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 1993, 123 (6, pt 2): 1777-1788.
11. Furuse M., Fujita K., Hiiragi T. et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 1998, 141 (7): 1539-1550.
12. He S.H. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2004, 10 (3): 309-318.
13. Katahira J., Inoue N., Horiguchi Y. et al. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin. *J. Cell Biol.* 1997, 136 (6): 1239-1247.
14. Sack D.A., Sack R.B., Nair G.B., Siddique A.K. Cholera. *Lancet*. 2004, 363 (9404): 223-233.

*Поступила 10.05.15*

Контактная информация: Рыбальченко Оксана Владимировна, д.б.н., проф.,  
199106, С.-Петербург, ВО, 21 линия, 8а

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*В.П.Терлецкий<sup>1,2</sup>, В.И.Тыщенко<sup>1,2</sup>, О.Б.Новикова<sup>2</sup>, И.И.Новикова<sup>3</sup>, Э.Д.Джавадов<sup>2</sup>*

## **НОВЫЙ ПОДХОД К ГЕНОТИПИРОВАНИЮ ГОСПИТАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ CLOSTRIDIUM DIFFICILE**

<sup>1</sup>Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург-Пушкин; <sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства, Санкт-Петербург-Ломоносов; <sup>3</sup>Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург-Пушкин

*Цель.* Разработка нового подхода в генотипировании Clostridium difficile и испытание его на примере 140 госпитальных изолятов. *Материалы и методы.* Подход основан на идее двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ), использованного ранее при генотипировании других бактериальных патогенов. Был осуществлен подбор оптимальных ферментов рестрикции MluI и Mph1103I, оптимизированы условия проведения реакции ДРИМ. *Результаты.* Проведено генотипирование госпитальных изолятов C.difficile, рассчитан индекс дискриминации штаммов, сделаны выводы о возможностях метода в выяснении путей распространения и идентификации источников инфекции. *Заключение.* Разработанный метод генотипирования имеет ряд преимуществ над существующими методами и может применяться в решении вопросов эпидемиологии инфекций, вызванных C.difficile.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 9—15

Ключевые слова: геномная ДНК, бактерии, Clostridium difficile, генотипирование, молекулярная эпидемиология, ферменты рестрикции

V.P.Terletsky<sup>1,2</sup>, V.I.Tyschenko<sup>1,2</sup>, O.B.Novikova<sup>2</sup>, I.I.Novikova<sup>3</sup>, E.D.Dzhavadov<sup>2</sup>

## A NOVEL APPROACH TO GENOTYPING OF HOSPITAL ISOLATES OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Agricultural Animals, St. Petersburg-Pushkin; <sup>2</sup>All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry, St. Petersburg-Lomonosov; <sup>3</sup>All-Russian Research Institute of Plants Protection, St. Petersburg-Pushkin, Russia

*Aim.* Development of a novel approach in genotyping of *Clostridium difficile* and its testing on the example of 140 hospital isolates. *Materials and methods.* The approach is based on an idea of double digest and selective label (DDSL), used previously during genotyping of other bacterial pathogens. Selection of optimal enzymes for restriction of MluI and Mph1103I was carried out, condition of DDSL reaction execution were optimized. *Results.* Genotyping of *C. difficile* hospital isolates was carried out, index of strain discrimination was calculated, conclusions regarding possibilities of the method in elucidation of spread pathways and identification of infection sources were made. *Conclusion.* The developed method of genotyping has a number of advantages over the existing method and can be used to address issues in epidemiology of infections caused by *C. difficile*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 9—15

Key words: genome DNA, bacteria, *Clostridium difficile*, genotyping, molecular epidemiology, restriction enzymes

## ВВЕДЕНИЕ

*Clostridium difficile* является одним из наиболее распространенных и опасных микроорганизмов в спектре внутрибольничных инфекций, обнаруживается в микрофлоре кишечника у 80% здоровых детей в возрасте до 1 года и у 1 — 5% здоровых взрослых. В то же время, у госпитализированных взрослых носительство может достигать 20 — 40% [2].

Несмотря на значительное число публикаций по эпидемиологии *C. difficile*, остается спорным вопрос об эндо- и экзогенном характере инфекции и путях передачи возбудителя [1]. Внутрибольничные случаи заболевания могут носить как спорадический, так и эпидемический характер. Эпидемическое распространение получают лишь отдельные штаммы, например риботип 1 и риботип 027, производящие в 20 раз больше токсинов А и В, чем другие патогенные штаммы [8, 11]. Кроме того, отмеченные штаммы устойчивы ко многим широко используемым антибиотикам [6].

Эффективный контроль над вспышками заболевания возможен при быстрой идентификации изолятов, позволяющей дифференцировать эпидемические и спорадические штаммы. В отношении *C. difficile* разработаны и используются несколько методов генотипирования. Наиболее распространенным сейчас в Европе является метод риботипирования, основанный на вариабельности интергенного участка между 16S и 23S генами рибосомной ДНК. В США предпочтение отдают методу пульс-гель электрофореза. Используется также метод выявления вариаций тандемных повторов ДНК (MLVA) и секвенирование генов домашнего хозяйства (MLST). К сожалению, эти методы не лишены недостатков. В частности, риботипирование часто не различает эпидемиологически неродственные изоляты, т.е. обладает недостаточной дискриминационной способностью. Пульс-гель электрофорез проводится в течение длительного времени и требует значительных материальных и людских затрат [7]. Секвенирование является дорогостоящей процедурой и иногда не позволяет добиться необходимого уровня дискриминации штаммов [4].

Целью нашего исследования было адаптировать разработанный ранее метод двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ) к геному *S. difficile*. Метод ДРИМ доказал свою эффективность в прямых сравнениях с пульс-гель электрофорезом на клинических изолятах *Pseudomonas aeruginosa* в условиях госпиталя кантона Во в Швейцарии [10]. Метод технически не сложен, основан на использовании обычного лабораторного оборудования, имеет высокую дискриминационную способность.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ включили 140 чистых культур *S. difficile*, выделенных от пациентов стационара и отделения интенсивной терапии кантонального госпиталя в Швейцарии. На первом этапе стояла задача выделения геномной ДНК из этого микроорганизма. Стандартная процедура экстракции ДНК в отношении *S. difficile* не подходит, так как клеточная стенка этой грамм-положительной бактерии резистентна к лизоциму. Испытание ряда методик позволило подобрать оптимальный метод выделения ДНК. Ночную культуру *S. difficile*, выращенную в анаэробных условиях в контейнере, центрифугировали в 1,5 мл пробирках типа эппендорф в течение 5 минут при 8000 g. Осадок бактериальных клеток суспендировали в 200 мкл 50 mM ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), в суспензию вносили лизоцим в концентрации 100 мг/мл до конечной концентрации 10 мг/мл. Инкубировали смесь при 37°C 10 минут. Короткого времени инкубации с лизоцимом было достаточно для частичного нарушения целостности клеточной стенки. Дальнейшее разрушение стенки достигалось внесением 200 мкл лизирующего буфера следующего состава: 5 M гуанидинтиоцианат, 25 mM ЭДТА, 2% лаурилсаркозин, 1% тритон X100. После инкубации в течение 1 минуты в смесь вносили додецилсульфат натрия (SDS) до конечной концентрации 1%, инкубацию продолжали при комнатной температуре 1 минуту. После этого вносили равный объем (примерно 500 мкл) смеси фенол-хлороформ, пробирки встряхивали 3 минуты и центрифугировали при 12 000g в течение 10 минут. Отбирали верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, в новую пробирку. ДНК осаждали равным объемом пропанола, промывали в 70% этаноле, подсушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл буфера TE (10 mM трис, 1 mM ЭДТА, pH 8,0). Через 30 минут растворения ДНК готова к использованию для генотипирования.

Метод ДРИМ основан на одновременном расщеплении геномной ДНК микроорганизма двумя рестрикционными эндонуклеазами [9, 10] и избирательном мечении отдельных фрагментов ДНК. Одна из рестриктаз при расщеплении ДНК образует ограниченное число фрагментов с так называемыми липкими концами, которые включают биотинилированный дезоксицитозинтрифосфат (Bio-14-dCTP, Invitrogen™). В то же время, многочисленные фрагменты ДНК, образованные второй рестриктазой, дают только тупые либо 5'-усеченные концы, которые не включают метку. Такая избирательность мечения позволяет уменьшить число

**Ферменты рестрикции для уменьшения размера фрагментов ДНК в ферментативной реакции ДРИМ и их основные характеристики**

Фермент	Сайт расщепления	Число сайтов в геноме <i>S. difficile</i>	Оптимальный буфер	Эффективность лигирования (%)
Mph1103I	ATGCA'T	1222	R	95
Eco32I	GAT'ATC	755	R	95
BsuRI	GG'CC	937	R	95
HincII	GTY'RAC	1402	Tango™	95
Bst1107I	GTA'TAC	1091	O	90

фрагментов ДНК с нескольких тысяч до нескольких десятков и выявить эти фрагменты на фильтре после их разделения по размеру в обычном агарозном геле. При отборе ферментов уделяли внимание также способности проявлять активность в одном буфере, специфичности, коммерческой доступности и цене. Ряд ферментов-кандидатов, удовлетворяющих требованиям ДРИМ, представлены

в табл. Все ферменты рестрикции и реакционные буфера были произведены Thermo Fisher Scientific™.

Анализ по программе *in-silico* [3] позволил подобрать оптимальную комбинацию ферментов рестрикции для каждого биологического вида патогена. В частности, для *S.difficile* лучшими ферментами были MluI (39 сайтов расщепления) и MphI103I (1222 сайтов расщепления).

Метод ДРИМ включает в себя следующие последовательные этапы: а) реакцию двойного расщепления и избирательного мечения, б) электрофорез в 0,8% агарозном геле, в) перенос в дистиллированной воде фрагментов ДНК на нейлоновый фильтр, г) детекция сигнала.

Протокол ДРИМ очень прост: в пробирку вносили 15 мкл воды, 2 мкл буфера для рестриктаз, 2 мкл ДНК и 1 мкл ферментной смеси. Ферментную смесь из расчета на одну реакцию делали путем смешивания двух ферментов рестрикции MluI и MphI103I (2 — 3 е.а.), Taq-полимеразы (0,2 е.а.) и Bio-14-dСТР (конечная концентрация 0,1 мкМ). Пробирку ставили в термостат на 1 — 2 часа. После этого смесь вносили в лунки для агарозного электрофореза. Разделение фрагментов ДНК осуществляли в течение 16 часов (ставили на ночь). Результатом генотипирования методом ДРИМ является группа фрагментов ДНК в виде окрашенных полос на фильтре, распределение которых специфично для каждого штамма. После окончания реакции ДРИМ продукты двойного расщепления и мечения вносили в лунки стандартного 0,8% агарозного геля. Электрофорез проводили в течение 3 часов при напряжении 150 вольт в условиях рециркуляции буфера (обычный трис-ацетатный буфер), длина геля равна 25 см.

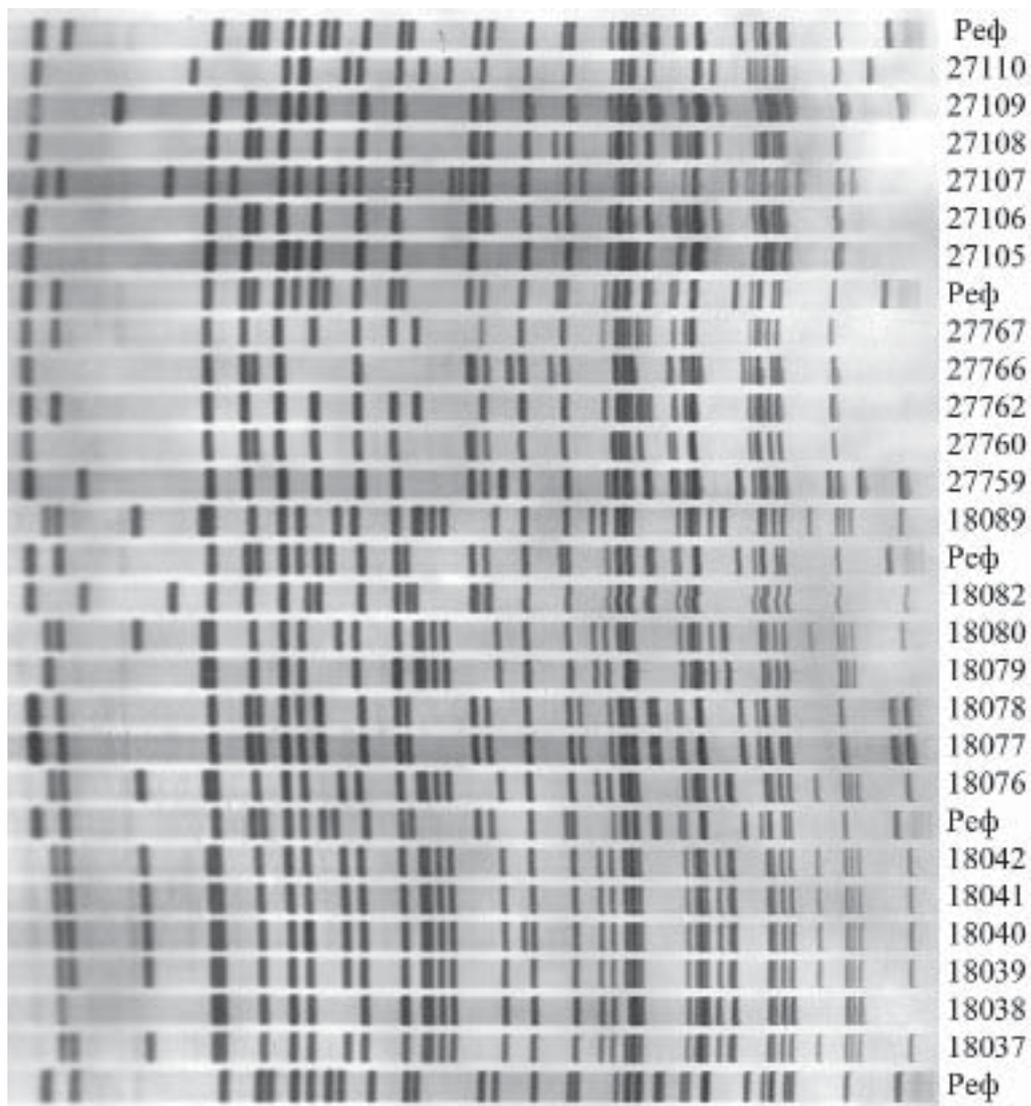
MLVA анализ проводили на этих же изолятах с использованием подхода Zaiss N. H. et al. [12]. Использовали следующие праймеры для амплификации полиморфных tandemных повторов: TR6-F 5'-TTTCAACTTGTCAGTTTTTAAGTC-3'; TR6-R 5'-ATGACATAGCGTTTTGTGGAAT-3'; TR10-F 5'-TGCATCAAATTGGTCAAGACTC-3'; TR10-R 5'-TGAAATCATTGACTATAAAGCAAAA-3'.

Амплификацию проводили с использованием 1 мкл геномной ДНК *S.difficile*, 200 мкМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0,1 мкМ праймеров, 1xПЦР буфер, 1 е.а. Hot Start Taq-полимеразы (Invitrogen™). После начальной денатурации ДНК при 96°C в течение 3 минут проводили 35 циклов при 96°C 45 секунд, 52°C 45 секунд, 72°C 45 секунд. Заканчивали реакцию инкубированием при 72°C в течение 7 минут. Общий объем смеси составлял 25 мкл, реакция проводилась в стандартных 96-луночных планшетах. После завершения ПЦР продукты реакции разделяли в агарозном геле, окрашивали флуоресцентным красителем GelRed™ (Bio-Rad™), фотографировали в системе гель-документации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Испытание различных комбинаций ферментов рестрикции в реакции ДРИМ позволило найти оптимальное сочетание (MluI и MphI10I). В этом случае типичная картина содержит около 40 фрагментов ДНК, равномерно расположенных вдоль фильтра (рис. 1).

Размер фрагментов ДНК составлял от 400 до 20 000 пар оснований. Используемый формат электрофорезной камеры и гребенки для формирования лунок позволил анализировать 24 штамма одновременно. При этом для удобства учета положения фрагментов ДНК на фильтре на каждую седьмую дорожку вносили референтный штамм *S.difficile*. В качестве референтного штамма в ходе предварительных экспериментов отбирали штамм, имеющий сравнительно равномерное распределение фрагментов в максимально широком диапазоне. Генетически идентичные штаммы выявляются в виде одинакового набора фрагментов ДНК на разных электрофоретических дорожках (например, штаммы 18041 и 18042). Близкие штаммы отличаются друг от друга на 1 — 3 фрагмента (штамм



**Рис. 1. Генотипирование группы изолятов *C.difficile* методом ДРИМ.**

Реф — референтный штамм, изоляты обозначены согласно номенклатуре в базе данных госпиталя.

18040 и 18041/18042). Генетически удаленные штаммы имели различное распределение многих фрагментов ДНК.

Из 140 изолятов были выявлены 117 неродственных штаммов (бактериальных генотипов), индекс дискриминации *D*, рассчитываемый по критерию Hunter P.R. and Gaston M.A. [5] был равен 0,98. Было выявлено 2 пациента, у которых обнаруживались одновременно по 2 близкородственных штамма, отличающихся всего на 1 — 3 фрагмента ДНК.

Эпидемиологические данные о нахождении пациентов в одних или соседних палатах и данные генотипирования позволили сделать вывод о том, что наряду с передачей инфекции между пациентами играет существенную роль и эндогенный характер заболевания. В частности, идентичность штаммов, выделенных у разных пациентов, находившихся в одной палате, свидетельствует о передаче инфекции. В ряде других случаев у пациентов из одной палаты выделяли совершенно разные

генотипы *S. difficile*, что подтверждает отсутствие эпидемического характера заболевания. Здесь можно говорить об эндогенном источнике заболевания, когда иммунная система не способна препятствовать размножению бактерий и микроорганизм приобретает свойства вирулентности в силу экспрессии генов экзотоксинов.

Метод MLVA, основанный на двух локусах TR6 и TR10 [12] выявил полиморфизм в тандемных повторах *S. difficile*, однако количество вариантов было ограниченным. Нам удалось наблюдать всего два размера ампликонов, дискриминационная способность двухлокусного MLVA оказалась низкой. Несмотря на это метод дает легко интерпретируемые результаты, разница в размере ампликонов достаточно большая для объективного анализа (рис. 2).

Такой подход можно рекомендовать для предварительной оценки генетического разнообразия в группах изолятов. Нужно отметить, что данный метод, в отличие от ДРИМ, не обладает 100% типизируемостью, т.е. отдельные изоляты не могут быть типированы в силу отсутствия амплификата. В частности, такими оказались изоляты 27109 и 27110. Изоляты 27760 и 27762 имели не только отличающиеся от остальных изолятов ампликоны, но и выраженные различия в распределении фрагментов ДНК при генотипировании методом ДРИМ.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанный метод ДРИМ позволяет выявлять одновременно до 40 фрагментов ДНК, что значительно больше, чем при использовании метода пульс-гель электрофореза. Объясняется такая особенность предлагаемого метода коротким временем проведения и односторонним направлением электрического поля стандартного геля электрофореза, что позволяет получать четко различимые фрагменты ДНК. В случае пульс-гель электрофореза время анализа достигает 24 — 48 часов при изменяющемся направлении тока. Эти условия определяют существенную диффузию фрагментов ДНК в геле, выявляемые полосы становятся широкими, что ограничивает возможность учета большого количества фрагментов (как правило, не более 15 — 20). Естественно, большее число учитываемых фрагментов означает большую дискриминационную способность метода, что мы и наблюдали в отношении других микроорганизмов [10]. Весь анализ, включая выделение геномной ДНК *S. difficile*, выполняется в течение одного рабочего дня. Метод не требует дорогостоящего специализированного оборудования, так как не основан на геномном секвенировании и полимеразной цепной реакции, прост и удобен в применении. Получаемый результат в виде фрагментов ДНК может легко документироваться с использованием любого сканера и программ анализа изображений, таких как BioNumerics™. Программа позволяет не только идентифицировать бактериальные штаммы, но и объединять штаммы в генетически родственные группы (кластеры), строить филогенетическое древо и т.д.

Тестирование двухлокусного метода генотипирования, основанного на полиморфизме тандемных повторов MLVA в варианте Zaiss N.H. et al. [12], на нашем наборе изолятов *S. difficile* показало, что этот метод не отличается достаточной

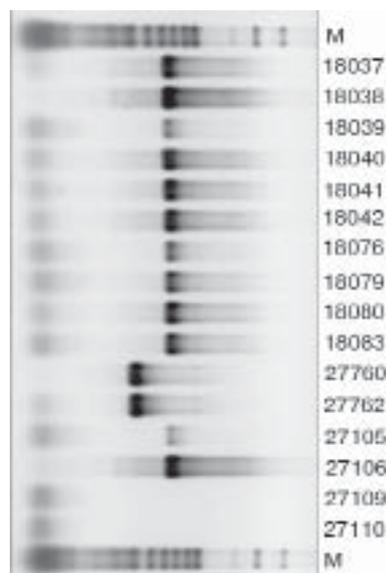


Рис. 2. Фрагмент планшеты с группой изолятов *S. difficile*, генотипированных методом MLVA по двум локусам.

М — маркер длин фрагментов ДНК.

дискриминационной способностью и может использоваться лишь в качестве предварительного скрининга. Если эпидемиологически неродственные изоляты не будут иметь отличий при MLVA скрининге, их необходимо генотипировать более высокоразрешающими методами, такими как ДРИМ. Таким образом, метод ДРИМ, отличаясь простотой и быстротой выполнения анализа, позволяет проводить идентификацию штаммов *C.difficile* с высоким разрешением. В наших исследованиях возможности метода генотипирования ДРИМ были показаны на выборке из 140 госпитальных изолятов микроорганизмов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лобзин Ю.В., Захаренко С.М., Иванов Г.А. Современные представления об инфекции *Clostridium difficile*. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002, 4 (3): 200-232.
2. Barlett J.C. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann. Intern. Med.* 2006, 145 (10): 758-764.
3. Bikandi J., San Millan R., Rementeria A. et al. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics.* 2004, 20 (5): 798-799.
4. 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.
5. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of the Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988, 26: 2465-2466.
6. Joost I., Speck K., Herrmann M. et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates by *slpA* and *tcdC* gene sequencing. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009, 33: 13-18.
7. Mitani N., Koizumi A., Sano R. et al. 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.
8. Stubbs S.L., Brazier J.S., O'Neill G.L. et al. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37: 461-463.
9. 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 (2): 135-142.
10. Terletskiy V., Kuhn G., Francioli P. et al. Application and evaluation of double digest selective label (DDSL) typing technique for *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates. *J. Microbiol. Methods.* 2008, 72 (3): 283-287.
11. Wiegand P.N., Nathwani D., Wilcox M.H. et al. Clinical and economic burden of *Clostridium difficile* infection in Europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection. *J. Hosp. Infect.* 2012, 81: 1-14.
12. Zaiss N.H., Rupnik M., Kuijper E.J. et al. Typing *Clostridium difficile* strains based on tandem repeat sequences. *BMC Microbiol.* 2009, 9: 6.

*Поступила 15.06.15*

Контактная информация: Терлецкий Валерий Павлович, д.б.н., проф.,  
196625, Санкт-Петербург-Пушкин, Московское ш., 55 а, р.т. (812)451-76-63

## ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *LACTOBACILLUS FERMENTUM* 90 TC-4

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной, <sup>2</sup>НПО «Микроген», Нижний Новгород

*Цель.* Подтверждение таксономического положения штамма *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 с использованием фенотипических (классический микробиологический, MALDI TOF масс-спектрометрия) и генетических (секвенирование фрагмента гена 16S рРНК и полногеномное секвенирование) методов. *Материалы и методы.* Объект исследования — штаммы *L. fermentum* 90 TC-4 из различных коллекций. Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью MALDI TOF масс-спектрометра Autoflex (Bruker Daltonics, Германия), изучение биохимических свойств штамма проводили с использованием стрипов API 50 CH<sub>L</sub> (Biomerieux, Франция), для выделения геномной ДНК использовали набор «ДНК-сорб В» (ЦНИИЭ, Москва). Секвенирование наработанных фрагментов гена 16S рРНК проводили на секвенаторе GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter, США), полногеномное секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina). Сборка генома и биоинформационный анализ осуществляли с использованием программы BLAST ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), «CLC Bio Assembly» и геномного сервера RAST (<http://rast.nmpdr.org>). *Результаты.* Установлено, что штамм *L. fermentum* 90 TC-4 в ряде случаев загрязнен культурой *L. plantarum*. В результате идентификации чистой культуры штамма *L. fermentum* 90 TC-4 с использованием спектра высокотехнологичных методов доказано, что данный штамм относится к виду *L. fermentum*. *Заключение.* Подтвержден таксономический статус штамма *L. fermentum* 90 TC-4.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 16—23

Ключевые слова: *Lactobacillus fermentum*, пробиотические штаммы лактобацилл, MALDI TOF масс-спектрометрия, полногеномное секвенирование

А.Г.Точилина<sup>1</sup>, И.В.Белова<sup>1</sup>, И.В.Соловьева<sup>1</sup>, И.С.Горлова<sup>2</sup>, Т.П.Иванова<sup>1</sup>, В.А.Жирнов<sup>1</sup>

## CHARACTERISTICS OF BIOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS FERMENTUM* 90 TC-4 PROBIOTIC STRAIN

<sup>1</sup>Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, <sup>2</sup>«Microgen», Nizhny Novgorod, Russia

*Aim.* Confirmation of taxonomic position of *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 strain using phenotypic (classic microbiological, MALDI TOF mass-spectrometry) and genetic (16S rRNA gene segment sequencing and full genome sequencing) methods. *Materials and methods.* Object of the study — *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 strains from various collections. Mass-spectrometric analysis was carried out using Autoflex MALDI TOF mass-spectrometer (Bruker Daltonics, Germany), study of biochemical properties of the strain was carried out using API 50 CHL strips (Biomerieux, France), “DNA-sorb B” kit was used for isolation of genome DNA (CRIE, Moscow). Sequencing of the accumulated fragments of 16S rRNA gene was carried out using GenomeLab GeXP sequencing (Beckman Coulter, USA), full genome sequencing was carried out in MiSeq platform (Illumina). Assembly of genome and bioinformation analysis was carried out using BLAST program ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)), «CLC Bio Assembly» and genome server RAST ([rast.nmpdr.org](http://rast.nmpdr.org)). *Results.* *L. fermentum* 90 TC-4 strain was established to be contaminated by *L. plantarum* culture in a series of cases. As a result of identification of a pure culture of *L. fermentum* 90 TC-4 strain using a specter of high-technology methods, membership of the strain in *L. fermentum* species has been proven. *Conclusion.* Taxonomic status of *L. fermentum* 90 TC-4 strain was confirmed.