

3. Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Абрамова Е.Г. и др. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции. Биотехнология. 2018, 4 (34): 83-88.
4. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В. и др. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 2 (112): 78-81.
5. Германчук В.Г., Семакова А.П., Шавина Н.Ю. Этические принципы при обращении с лабораторными животными в эксперименте с патогенными биологическими агентами I-II групп. Проблемы особо опасных инфекций. 2018, 4: 33-38.
6. Сухарьков А.Ю., Назаров Н.А., Метлин А.Е. Диагностика бешенства животных методом иммуноферментного анализа, сравнение прямого и непрямого сэндвич-варианта. Ветеринария Кубани. 2011, 6: 12-14.
7. Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Шуралев Э.А. и др. Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1). Гены и клетки. 2014, 3 (9): 276-280.
8. Шарапова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К. и др. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе. Проблемы особо опасных инфекций. 2010, 103(1): 63-66.
9. Asgary V., Shoari A., Baghbani-Arani F. et al. Green synthesis and evaluation of silver nanoparticles as adjuvant in rabies veterinary vaccine. Int. J. Nanomedicine. 2016, 11: 3597-3605.
10. Bedekovic T., Lemo N., Lojic I. et al. Modification of the fluorescent antibody virus neutralization test — Elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. Journal of Virological Methods. 2013, 189: 204-208.
11. Caporale G.M.M., Silva A. de C.R., Peixoto Z.M.P. et al. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil. Journal of clinical laboratory analysis. 2009, 23: 7-13.
12. Dastkhosh M., Rahimi P., Haghighat S. et al. Cell culture extraction and purification of rabies virus nucleoprotein. Jundishapur journal of microbiology. 2014, 7(9): 1-4.
13. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Immunological properties of gold nanoparticles. Chem. Sci. 2017, (8): 1719-1735.
14. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in minodisperse gold suspension. Nat. Phys. Sci. 1973, 241(105): 20-21.
15. WHO Expert Consultation on Rabies: third report. WHO technical report series 1012. Geneva, Switzerland. 2018.

Поступила 07.05.19

Контактная информация: Гаврилова Юлия Кирилловна,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452) 26-21-31

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

О.С.Бондарева, Г.А.Ткаченко, М.Л.Леденева, А.А.Батулин, Л.В.Лемасова, И.М.Шпак, А.А.Будченко

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ САПА НА ОСНОВЕ МУЛЬТИЛОКУСНОГО АНАЛИЗА ЧИСЛА ВАРИАБЕЛЬНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Разработка сокращенной схемы MLVA-типирования возбудителя сапа и оценка возможности ее применения для дифференциации штаммов *B. mallei* и изучения их генетического полиморфизма. *Материалы и методы.* Объектами исследования служили 14 штаммов *Burkholderia mallei* из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и 12

полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов возбудителя сапа, представленных в GenBank NCBI. При выборе VNTR-локусов для типирования возбудителя сапа использовали набор из 32 локусов, предложенных для дифференциации возбудителя мелиоидоза. Для определения размера VNTR-фрагментов использовали электрофорез в полиакриламидном геле, секвенирование и фрагментный анализ. *Результаты.* Выбраны наиболее вариабельные у возбудителя сапа VNTR-локусы (993, 3145, 3652, 20, 2862 и 1217), которые включены в итоговую схему MLVA-типирования. Оптимизированы условия проведения и учета результатов MLVA-типирования. *Заключение.* Анализ результатов типирования 26 штаммов *B. mallei* показал высокую дискриминирующую силу разработанного способа внутривидовой дифференциации возбудителя сапа на основе 6-локусной MLVA-схемы и перспективность его использования при эпидемиологическом расследовании для установления источника вспышки сапа.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 8–16

Ключевые слова: *Burkholderia mallei*, сап, MLVA, VNTR, генотипирование

O.S.Bondareva, G.A.Tkachenko, M.L.Ledeneva, A.A.Baturin, L.V.Lemasova, I.M.Shpak, A.A.Budchenko

DEVELOPMENT OF GENOTYPING METHOD OF THE GLANDERS CAUSATIVE AGENT BASED ON MULTIPLE LOCUS VARIABLE-NUMBER TANDEM REPEAT ANALYSIS

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

The aim was to develop a short MLVA-typing scheme of the causative agent of glanders and to assess the possibility of its use for differentiation of *Burkholderia mallei* strains and study their genetic polymorphism. *Materials and methods.* The study was carried out on 14 *B. mallei* strains from the collection of the Volgograd Research Institute for Plague Control and 12 whole genome sequences of the *B. mallei* strains presented in GenBank NCBI. A set of 32 loci proposed for differentiation of the melioidosis pathogen was used to select VNTR-loci for typing the causative agent of glanders. Polyacrylamide gel electrophoresis, sequencing, and fragment analysis were applied to detect the size of the VNTR fragments. *Results.* VNTR loci 993, 3145, 3652, 20, 2862, and 1217, which were selected as the most variable among the causative agent of glanders, were included in the final MLVA typing scheme. The parameters of setting and detecting the results of MLVA typing have been optimized. *Conclusion.* Analysis of the typing results of 26 *B. mallei* strains showed a high discriminating power of the developed method of intraspecies differentiation of glanders pathogen based on 6-loci MLVA-scheme and the prospects of its use for epidemiological investigation to determine the source of the glanders outbreak.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 8–16

Key words: *Burkholderia mallei*, glanders, MLVA, VNTR, genotyping

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель сапа *Burkholderia mallei* относится к патогенным представителям рода *Burkholderia*, вызывает тяжелое инфекционное заболевание у человека и довольно широкого круга животных, протекающее как в хронической, так и в острой форме с развитием сепсиса, образованием специфических гранулем и абсцессов в органах и тканях. Данная инфекция в естественных условиях встречается преимущественно у непарнокопытных животных, таких как лошади, ослы, мулы, а также у представителей семейств кошачьих и верблюдовых [6]. Заражение людей происходит при контакте с больными животными и обычно заболевание имеет спорадический характер. Однако возбудитель сапа крайне опасен в лабораторных условиях, описаны случаи заболевания исследователей из США и России [5; Van Zandt K.E. et al., 2013].

Тяжелое течение сапа в сочетании со стертой клинической картиной приводят к высокой смертности, достигающей 95% в случае развития сепсиса. Возбудитель сапа включен в список потенциальных агентов биотерроризма как в Российской Федерации, так и за рубежом, и относится ко второй группе патогенности в соответствии с СП 1.3.3118-13 [6; Van Zandt K.E. et al., 2013].

В последнее время случаи сапа регистрируют не только в эндемичных регионах Южной Азии, Африки, Бразилии, но и в странах, где его ранее не выявляли, например, в Объединенных Арабских Эмиратах, Бахрейне, или на территориях, где его считали ликвидированным, например, в Германии, Индии [9; Scholz H.C. et al., 2014]. Несмотря на отсутствие официально зарегистрированных случаев сапа в Российской Федерации, существует опасность заноса инфекции из-за рубежа, с территории близлежащих стран (Монголия, Турция, Иран и др.).

Для контроля над данной инфекцией необходимо совершенствовать методы идентификации и типирования *B. mallei*, что позволит своевременно диагностировать сап, исследовать выделенную культуру и установить источник заражения. При выборе метода генотипирования учитывают дискриминирующую силу, воспроизводимость, возможность сравнения данных полученных в разных лабораториях и корреляцию с географическим регионом происхождения штаммов. Данным параметрам соответствует мультилокусный VNTR-анализ, который с успехом применен для многих микроорганизмов, в том числе возбудителей особо опасных инфекций. При этом для типирования разработаны схемы с различным количеством VNTR-локусов: от 4 до 42 [3, 4, 10]. Повышение числа тестируемых локусов придает большую достоверность филогенетическому и эпидемиологическому анализу, однако сопровождается возрастанием продолжительности, трудоемкости и стоимости исследования.

В зарубежной литературе описано применение для анализа штаммов возбудителя сапа 32 и 23 VNTR-локусов, выбранных для возбудителя мелиоидоза, однако оптимизацию и проверку эффективности данного набора локусов для типирования *B. mallei* не проводили [8; Scholz H.C. et al., 2014]. В связи с этим, актуальной задачей является выбор локусов, наиболее перспективных для внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя сапа.

Цель работы — разработка сокращенной схемы MLVA-типирования возбудителя сапа и оценка возможности ее применения для дифференциации штаммов *B. mallei* и изучения их генетического полиморфизма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования было использовано 14 штаммов возбудителя сапа из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Подготовку проб и обеззараживание материала для молекулярно-генетических исследований проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13, МУ 1.3.2569-09 и МУ 4.2.2831-11. Штаммы возбудителя сапа выращивали на агаре с гидролизатом казеина, содержащем 5% глицерина, при 37°C в течение 2 суток.

Для анализа нуклеотидных последовательностей геномов штаммов *B. mallei* ATCC 23344, *B. mallei* NCTC 10229, *B. mallei* NCTC 10247, *B. mallei* SAVP1 на наличие и вариабельность фрагментов, содержащих тандемные повторы, использовали алгоритм BLASTn и базу данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

ДНК выделяли из суспензий клеток чистых культур штаммов *B. mallei* из разведения в концентрации 1×10^8 м.к./мл с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). ПЦР

проводили на термоциклере «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия). В состав реакционных смесей входили праймеры (синтезировали в ООО «Синтол», Россия), дНТФ (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), ПЦР-смесь-2 blue (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), ДНК исследуемого штамма *B. mallei*.

Электрофорез продуктов амплификации проводили в 3% агарозном геле при напряженности 5 В/см в течение 60 мин. Электрофорез в полиакриламидном геле осуществляли в камере для вертикального электрофореза PROTEAN II xi Cell 20 (BioRad», США). Результаты фиксировали в фоторегистрирующей системе «GelDoc» (BioRad, США). Для обработки ДНК-профилей, полученных после электрофореза в ПААГ, использовали программу RFLPscan 3.12 (CSP Inc., USA).

Секвенирование и фрагментный анализ проводили в капиллярном массиве длиной 50 см с полимерной матрицей POP-7 на автоматическом генетическом анализаторе «ABI 3130 Genetic Analyzer» («Applied Biosystems», США). Для секвенирования использовали набор реактивов «Big-Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems», США). В качестве размерного стандарта при проведении фрагментного анализа использовали S450 (ООО «Синтол», Россия). Для калибровки генетического анализатора применяли «Спектральный калибратор для ABI Prizm Any5Dye — FAM, R6G, TAMRA, ROX, LIZ» (ООО «Синтол», Россия). Обработку полученных на генетическом анализаторе данных проводили с помощью программного обеспечения «Applied Biosystems» (США).

Анализ уровня генетического родства и построение дендрограмм проводили в программе TreeCon for Windows v.1.3b с использованием метода объединения ближайших соседей (Neighbor joining) с коэффициентом генетической дистанции M. Nei и W.H. Li. Для оценки дискриминирующей способности использовали индекс Хантера-Гастона (HGDI) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки схемы типирования возбудителя сапа на основе мультилокусного анализа числа tandemных повторов мы использовали набор из 32 VNTR локусов, предложенных U'Ren J. M. et al. для генотипирования штаммов близкородственного *B. pseudomallei* [1]. Анализировали наличие и количество повторов в данных локусах в геноме четырех штаммов *B. mallei* (ATCC 23344, NCTC 10229, NCTC 10247, SAVP1). Установлено, что только 4 VNTR-локуса характеризовались различным числом повторов у каждого из штаммов возбудителя сапа, половина последовательностей полностью отсутствовала во всех полных геномах возбудителя сапа. Четыре VNTR-локуса не обнаружены у 1-3 штаммов возбудителя сапа. Из VNTR-фрагментов, присутствующих у всех проанализированных штаммов возбудителя сапа, в качестве мишеней для генотипирования отобрали локусы, представленные в трех и более аллельных вариантах. Данным критериям соответствовали локусы 993, 2065, 3145, 3652, 20, 1367, 1764, 1217, 2862, 2356, вариабельность которых в дальнейшем исследовали на штаммах возбудителя сапа из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

На следующем этапе работы подбирали оптимальные условия ПЦР выбранных 10 VNTR-локусов и определяли успешность их амплификации. Постановку ПЦР проводили в следующем температурном режиме: 5 мин денатурация при 95°C; затем 40 циклов: 10 с денатурация — 95°C, 10 с отжиг праймеров с оптимальной для каждого локуса температурой, 40 с элонгация цепи при 72°C; в конце в течение 2 мин финальная полимеризация. После проведения электрофореза в агарозном ге-

ле оценивали результаты амплификации. Большинство локусов характеризовались наличием специфичных ампликонов у каждого штамма. Однако у всех штаммов *B. mallei* отсутствовали ампликоны локуса 2356, а VNTR-локус 2065 характеризовался наличием двойных аллелей у части исследованных штаммов, затрудняющих анализ данных, в связи с этим они были исключены из работы.

Далее определили аллельные варианты локусов 993, 3145, 3652, 20, 1367, 1764, 1217 и 2862 у исследуемых штаммов, для чего провели электрофорез в полиакриламидном геле и относительно маркера установили размер ампликонов. При выборе оптимальных условий проведения электрофореза изменяли следующие параметры: процентный состав полиакриламидного геля (6 и 8%), количество исследуемого ПЦР продукта, напряженность электрического поля (4-7 В/см) и длительность электрофореза (4-24 ч). При высоком напряжении наблюдали смещение полос ДНК в крайних дорожках геля, что препятствовало точности анализа. В дальнейшем использовали электрофорез в 8% ПААГ при напряженности 5 В/см более 20 ч, при котором регистрировали наиболее четкие полосы на электрофореграммах (рис. 1).

С помощью обработки изображений в программе RFLPscan 3.12 установили размер всех анализируемых ампликонов. Затем подсчитали количество аллельных вариантов и оценили число повторов в исследуемых VNTR-локусах.

Подсчет количества тандемных повторов у анализируемых штаммов *B. mallei* показал высокую вариабельность и стабильность амплификации локусов 993, 3145, 3652, 20, 2862. VNTR-локус 1217 амплифицировался у 57% штаммов *B. mallei*, при этом выявлено четыре аллеля, что свидетельствовало о достаточной полиморфности. Ампликоны VNTR-фрагмента 1367 зарегистрированы у половины штаммов и были представлены только в двух аллельных вариантах. Локус 1764 имел одинаковую длину и был обнаружен у 78% исследуемых штаммов. Наиболее вариабельные и перспективные для типирования штаммов *B. mallei* локусы 993, 3145, 3652, 20, 2862 и 1217 включили в сокращенную MLVA-схему.

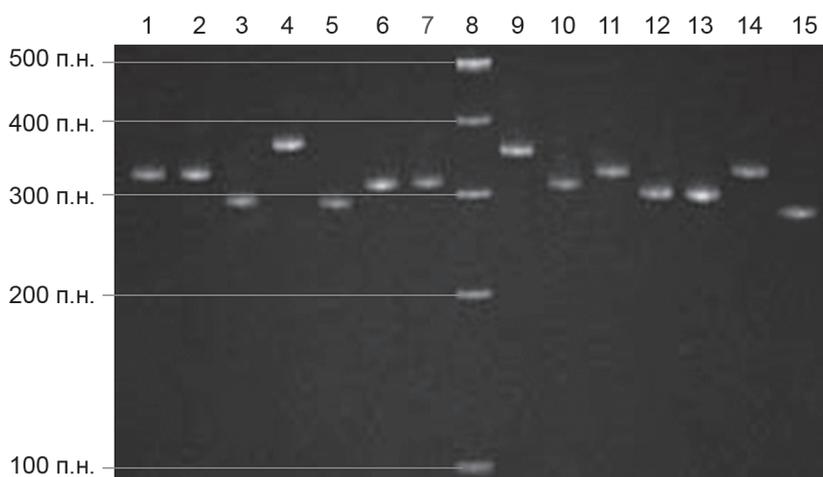


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации VNTR-локуса 2862 коллекционных штаммов возбудителя сапа.

1 — *B. mallei* Ц-4, 2 — *B. mallei* Ц-5, 3 — *B. mallei* 11, 4 — *B. mallei* Muksuwar-11, 5 — *B. mallei* 8, 6 — *B. mallei* В-120, 7 — *B. mallei* Zagreb, 8 — маркер молекулярных размеров 100-1000 п.н., 9 — *B. mallei* Bogor-37, 10 — *B. mallei* Р-1, 11 — *B. mallei* 10230, 12 — *B. mallei* Иванович, 13 — *B. mallei* 5584, 14 — *B. mallei* Z-12, 15 — *B. mallei* Будапешт.

Для уточнения количества повторов определили нуклеотидные последовательности продуктов амплификации выбранных VNTR-локусов, соответствующих разным аллельным вариантам. В большинстве случаев количество повторов совпало с определенным на основе электрофореза, однако в локусе 20, который характеризуется самым маленьким размером повтора, зарегистрированы отличия на один повтор у отдельных штаммов. Поэтому учитывая вероятность ошибки и большую трудоемкость при проведении электрофореза в полиакриламидном геле, а также высокую себестоимость секвенирования всех локусов каждого штамма, в дальнейшем для оптимизации метода детекции размера ампликонов использовали фрагментный анализ ампликонов.

Для фрагментного анализа одновременно трех локусов синтезировали праймеры 933f, 20f, меченные флуорофором FAM, праймеры 1217f и 3145f, меченные флуорофором HEX, а флуорофор ROX использования для праймеров 2862f и 3652f. Данный подход обеспечил точное определение размеров всех ампликонов, при этом для каждого штамма параллельно анализировали размер VNTR-локусов 993, 3145 и 3652 в одной смеси и локусов 20, 1217, 2862 в другой смеси.

Далее проверяли различные комбинации праймеров для исследования возможности коампликации трех фрагментов в одной пробирке. При постановке мультиплексной ПЦР отжиг праймеров проводили при 70°C в течение 10 сек, остальные параметры оставили без изменений. В ходе экспериментов была установлена совместимость в одной реакционной смеси VNTR-локусов 993, 3145 и 3652, в другой смеси амплифицировали локусы 20 и 1217. В серии опытов определили необходимое количество праймеров в мультиплексной ПЦР: по 0,2 пмоль прямого и обратного праймеров для амплификации локуса 933, по 0,12 пмоль праймеров для локуса 3145. Вторая смесь содержала по 0,15 пмоль праймеров 20f/20r по 0,1 пмоль праймеров 1217f/1217r. После оптимизации условий ПЦР достигнута эффективная амплификация данных локусов и на электрофореграммах регистрировали только специфичные полосы.

Установлено, что размер ампликонов локуса 2862 практически совпадал с размером продуктов амплификации VNTR-локуса 20 у штаммов *B. mallei* P1, *B. mallei* 11, *B. mallei* Ц-4, *B. mallei* Ц-5. Поскольку перед запуском фрагментного анализа проверку успешности амплификации и концентрацию фрагментов проводили путем электрофореза в 3% агарозном геле, то близкие размеры данных VNTR-фрагментов затрудняли оценку результатов, в связи с этим амплификацию локуса 2862 решено проводить в отдельной пробирке. После окончания ПЦР и проведения электрофореза ампликоны локуса 2862 смешивали с ампликонами локусов 20 и 1217.

Продукты реакции в зависимости от интенсивности свечения на электрофореграмме разводили в 400-500 раз и смешивали с формамидом и внутренним стандартом S450 в соотношении 1:8:1. Для денатурации фрагментов ДНК смеси выдерживали при 95°C в течение 3 мин и при 4°C — 10 мин, затем переносили в плашку и помещали в генетический анализатор для осуществления фрагментного анализа.

Длина фрагментов ДНК, определенная с помощью фрагментного анализа не много отличалась от их реальной длины. Поэтому для расчета длины фрагментов без повторов использовали штамм *B. mallei* B120, количество повторов в локусах которого определено с помощью секвенирования, это позволило корректно определить размеры всех VNTR-фрагментов у всех штаммов возбудителя сапа, а также обеспечило возможность сопоставления полученных нами данных с результатами других исследователей.

После определения длин ампликонов исследуемых локусов рассчитано количество повторов в них у штаммов *B. mallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. На основании полученных результатов для каждого штамма определен индивидуальный MLVA-профиль, содержащий комбинацию количества повторов по исследуемым локусам. Установлено, что типирование возбудителя сапа на основе анализа выбранного набора VNTR-локусов позволяет разделить 14 штаммов *B. mallei* на 13 MLVA-типов.

Далее для оценки эффективности предлагаемой нами схемы в анализ включили 12 полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов возбудителя сапа, представленных в базе данных GenBank NCBI. Помимо четырех геномов *B. mallei*, на основе которых проводили выбор VNTR-локусов, отобрали 8 штаммов возбудителя сапа с различными сведениями об источнике их происхождения. MLVA-профили штаммов определили *in silico*. При сопоставлении результатов типирования всех штаммов *B. mallei* установлено, что разработанная схема генотипирования на основе анализа числа tandemных повторов шести локусов позволяет разделить 26 проанализированных штаммов на 24 MLVA-типа. Индекс Хантера-Гастона (HGDI) сокращенной схемы MLVA-типирования равен 0,99, что свидетельствует о высокой дискриминирующей силе. Также мы оценили вариабельность каждого локуса в отдельности, индекс дискриминации HGDI варьировал от 0,78 у локуса 1217 до 0,89 у локуса 2862. Наибольшее количество аллелей выявлено у локусов 993 и 3652. Сравнительная характеристика 6 VNTR-локусов по результатам генотипирования 26 штаммов возбудителя сапа представлена в табл.

На основании MLVA-профилей исследованных штаммов возбудителя сапа построили дендрограмму методом Neighbor-Joining и провели кластерный анализ (рис. 2).

Штаммы возбудителя сапа из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора распределились по различным ветвям дендрограммы, что согласуется с разнообразием источников их происхождения. Единый MLVA-тип характерен для штаммов *B. mallei* Ц-4 и *B. mallei* Ц-5 из Монголии, также одинаковым профилем обладают штаммы *B. mallei* ATCC 23344 и *B. mallei* FMH, выделенный после заражения сапом сотрудника лаборатории, работавшего со штаммом *B. mallei* ATCC 23344. В отдельный кластер объединены часть штаммов Восточно-Европейского происхождения: *B. mallei* Иванович и *B. mallei* P-1 из Югославии, *B. mallei* 5584 из России, *B. mallei* Будапешт из Венгрии, *B. mallei* 8 и *B. mallei* 11 из Польши. Штаммы из Индии *B. mallei* Muksuwar-11 и Индонезии *B. mallei* Bogor-37 расположены в одной группе со штаммом из Югославии *B. mallei* Zagreb. Штамм *B. mallei* B-120 находится на значительном генетическом расстоянии от остальных штаммов на одной ветви со штаммом из Бахрейна. Последнюю группу формируют штаммы *B. mallei* NCTC 10229 и *B. mallei* 2002734299, выделенные в Венгрии, и штамм *B. mallei* 10230 из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-иссле-

Характеристика VNTR-локусов в геноме *B. mallei*

VNTR-локус	Последовательность повтора	Длина повтора, п.н.	Количество аллелей	Индекс HGDI
993	CGGCGAGGGAAA	12	9	0.88
3145	CCTTCCTCG	9	7	0.81
3652	CCGTAGTC	8	9	0.88
20	CGCCTCA	7	8	0.84
1217	CGGACCTAGG	10	6	0.78
2862	CTCGCCTTTG	10	8	0.89

довательский противочумный институт Роспотребнадзора, информация о котором утеряна, но который, вероятно, имеет тот же регион происхождения.

Штаммы из Югославии представлены в нескольких кластерах, генетически удаленных друг от друга, но аналогичное распределение было получено после типирования данной коллекции штаммов возбудителя сапа методом DFR-анализа [2]. При анализе дендрограммы в целом можно проследить корреляцию между образованными группами и источниками происхождения штаммов, однако, как и в работе U'Ren et al., 2007, наибольшую достоверность наблюдали на уровне формирования конечных кластеров.

Анализ публикаций зарубежных исследователей показал, что за последние годы метод MLVA-типирования был применен для генетической характеристики штаммов возбудителя сапа из коллекций Медицинского научно-исследовательского института инфекционных болезней армии США, института микробиологии Бундесвера, исследования 15 штаммов из Пакистана, эпизоотологического расследования вспышек в Бахрейне, Объединенных Арабских Эмиратах [8, 11]. В работе Scholz H.C. et al., 2014, опубликованы генетические профили 75 штаммов возбудителя сапа, в том числе и штаммов *B. mallei* Zagreb, *B. mallei* Bogor-1, *B. mallei* BogorInnsbruck и *B. mallei* Mukteswar. Данные штаммы аналогично штаммам из нашей коллекции выделены в Югославии, Индонезии и Индии соответственно. Анализ количества повторов в VNTR-локусах 993, 3145, 3652, 20 данных штаммов показал полное совпадение генетических профилей штаммов возбудителя сапа из коллекции института микробиологии Бундесвера и штаммов из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, что свидетельствует о достоверности данных, полученных в ходе работы, и возможности сопоставления результатов типирования, проводимых в различных лабораториях.

Таким образом, разработана схема генотипирования из шести VNTR-локусов, которая позволила провести внутривидовую дифференциацию штаммов возбудителя сапа с высокой дискриминирующей силой, разделив 26 штаммов *B. mallei* на 24 MLVA-типа. Сравнение профилей исследуемых штаммов показало генетическую гетерогенность штаммов возбудителя сапа из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. При обнаружении случаев сапа и выделении культуры возбудителя MLVA-типирование *B. mallei* по шести VNTR-локусам может быть рекомендовано для применения с целью эпидемиологического расследования и установления источника вспышки.

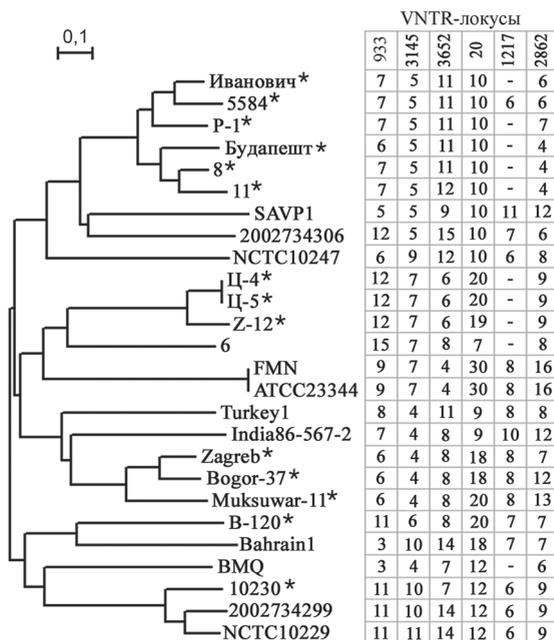


Рис. 2. NJ-Дендрограмма, построенная по результатам MLVA-типирования штаммов возбудителя сапа, и количество полных повторов в VNTR-локусах.

* Штаммы *B. mallei* из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.А., Алтухова В.В., Савченко С.С., Замараев В.С., Илюхин В.И., Алексеев В.В. Использование мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) и амплификации с произвольными праймерами (RAPD) для дифференциации штаммов возбудителя сапа. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2007, 3: 3-9.
2. Бондарева О.С., Савченко С.С., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Лемасова Л.В., Антонов В.А. Генотипирование штаммов *Burkholderia mallei* на основе метода амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2016, 1(34): 33-37.
3. Водопьянов А.С., Мишанькин Б.Н., Павлович Н.В., Пичурина Н.Л. Генотипическая гетерогенность и географическое разнообразие коллекционных штаммов *Francisella tularensis* по данным VNTR-анализа их ДНК. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2007, 2: 33-40.
4. Евсеева В.В., Платонов М.Е., Говорунов И.Г., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Дентовская С.В., Куличенко А.Н., Анисимов А.П. Сравнительный анализ MLVA25- и MLVA7-типирования по способности определять очаговую принадлежность штаммов *Yersinia pestis* на примере изолятов из центральнокавказского высокогорного очага чумы. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2016, 1(34): 37-40.
5. Никифоров В.В., Мельникова Л.И., Зарьков К.А., Кузовлев О.П., Лактионова Л.В., Зиновьев Г.А., Жданов А.С. Сап: случай из практики. Инфекционные болезни. 2005, 3(1): 89-92.
6. А. В. Топорков и др. Мелиоидоз и сап: коллективная монография (под ред. А.В. Топоркова). Волгогр. науч.-исслед. противочум. ин-т. Волгоград, «Волга-Пресс», 2016.
7. 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.
8. Hornstra H., Pearson T., Georgia S. et al. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. Emerg. Infect. Dis. 2009, 15(12): 2036-2039.
9. Kettle A.N., Wernery U. Glanders and the risk for its introduction through the international movement of horses. Equine Vet. J. 2016, 48(5): 654-658.
10. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M. et al. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. J. Clin. Microbiol. 2001, 39(9): 3179-3185.
11. Wernery U., Wernery R., Joseph M. et al. Natural *Burkholderia mallei* infection in Dromedary, Bahrain. Emerg. Infect. Dis. 2011, 17(7): 1277-1279.

Поступила 29.05.19

Контактная информация: Бондарева Ольга Сергеевна,
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)39-33-48

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

С.Б.Чекнёв, Е.И.Вострова, М.А.Сарычева, А.В.Востров

ИНГИБИРОВАНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ STREPTOCOCCUS PYOGENES В МЕХАНИЗМАХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ КАТИОНОВ ЦИНКА

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи, Москва

Цель. Оценка гемолитической активности в культуре *S.pyogenes*, претерпевающей торможение роста вследствие воздействия миллимолярных концентраций катионов цинка. *Материалы и методы.* Суспензию бактерий *S.pyogenes*, содержащую 10^8 КОЕ/мл, заседали газоном на чашки Петри с кровяным питательным агаром. Спустя 30 мин на поверхность газона с помощью 36-канального штампа-репликатора каплями объемом по 5 мкл наносили водные растворы солей