

- авирулентных форм *Francisella tularensis* к диссеминации и пролиферации в организме хозяина. Журн. икробиол. 1996, 2: 10-13.
12. Darveau R.P., Hancock R.E.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. J. Bacteriol. 1983, 155 (2): 831-838.
  13. De Pascalis R., Chou A.Y., Bosio C.M. et al. Development of functional and molecular correlates of vaccine-induced protection for a model intracellular pathogen, *F. tularensis* LVS. PLoS Pathog. 2012, 8 (1):1-14.
  14. Isherwood K.E., Titball R.W., Davies D.H. et al. Vaccination strategies for *Francisella tularensis*. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2005, 57 (9): 1403-1414.
  15. Khlebnikov V.S., Golovliov I., Kulevatsky D.P. et al. Outer membranes of lipopolysaccharide-protein complex (LPS-17 kDa protein) as chemical tularemia vaccines. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996, 13: 227-235.
  16. Oyston P.C., Griffiths R. *Francisella* virulence: significant advances, ongoing challenges and unmet needs. Expert. Rev. Vaccines. 2009, 8 (11): 1575-1585.
  17. Rahhal R.M., Vanden Bush T.J., McLendon M.K. et al. Differential effects of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide on B lymphocytes. J. Leukoc. Biol. 2007, 82: 813-820.
  18. Richard K., Mann B. J., Stocker L. et al. Novel cationic surfactant vesicle vaccines protect against *Francisella tularensis* LVS and confer significant partial protection against *F. tularensis* Schu S4 strain. Clin. Vac. Immunol. 2014, 21 (2): 212-226.
  19. Sandström G., Tärnvik A., Wolf-Watz H. Immunospecific T-lymphocyte stimulation by membrane proteins from *Francisella tularensis*. J. Clin. Microbiol. 1987, 25 (4): 641-644.
  20. Sjöstedt A., Sandström G., Tärnvik A. Several membrane polypeptides of the live vaccine strain *Francisella tularensis* LVS stimulate T cells from naturally infected individuals. J. Clin. Microbiol. 1990, 28 (1): 43-48.
  21. Surcel H.M., Sarvas M., Helander I.M., Herva E. Membrane proteins of *Francisella tularensis* LVS differ in ability to induce proliferation of lymphocytes from tularemia-vaccinated individuals. Microb. Pathog. 1989, 7 (6): 411-419.
  22. Tärnvik A. Nature of protective immunity to *Francisella tularensis*. Rev. Infect. Dis. 1989, 11 (3): 440-451.

Поступила 20.04.15

Контактная информация: Оноприенко Наталья Николаевна, к.б.н., 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863)240-27-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Д.В.Ульшина, Д.А.Ковалев, А.М.Жиров, Н.В.Жаринова, А.А.Худолеев, О.И.Коготкова, В.И.Ефременко, Н.И.Евченко, А.Н.Куличенко*

## **ОСОБЕННОСТИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ ПРОФИЛЕЙ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА ПРИ ПОДГОТОВКЕ КУЛЬТУРЫ НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ**

Ставропольский противочумный институт

*Цель.* С помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) провести сравнительный анализ белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза (*Brucella melitensis* Rev-1 и *Brucella abortus* 19ВА), выращенных на разных питательных средах: агар Альбими, бруцеллагар и эритрит-агар. *Материалы и методы.* Вакцинные штаммы: *Brucella melitensis* Rev-1 и *Brucella abortus* 19ВА. Белковое профилирование в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex «Bruker Daltonics». *Результаты.* Выявлен ряд характерных особенностей масс-спектров бруцелл: в частности, сохранение общего качественного состава белковых профилей культур и значительные различия в интенсивности отдельных пиков в зависимости от используемой питательной среды. *Заключение.* На основе анализа полученных данных показано, что применение агара Альбими в качестве питательной среды при подготовке образцов культур бруцелл для масс-спектрометрического анализа является оптимальным.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, белковое профилирование, возбудитель бруцеллеза

*D.V.Ulshina, D.A.Kovalev, A.M.Zhirov, N.V.Zharinova, A.A.Khudoleev, O.I.Kogotkova, V.I.Efremenko, N.I.Evchenko, A.N.Kulichenko*

## FEATURES OF MASS-SPECTROMETRIC PROTEIN PROFILES OF STRAINS OF BRUCELLOSIS CAUSATIVE AGENT DURING PREPARATION OF CULTURE ON VARIOUS NUTRIENT MEDIA

Stavropol Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Carry out comparative analysis using time-of-flight mass-spectrometry with matrix laser desorption/ionization (MALDI-TOF MS) of protein profiles of brucellosis causative agents (*Brucella melitensis* Rev-1 and *Brucella abortus* 19BA), cultivated in various nutrient media: Albimi agar, brucellagar and erythrit-agar. *Materials and methods.* Vaccine strains: *Brucella melitensis* Rev-1 and *Brucella abortus* 19BA. Protein profiling in linear mode on Microflex «Bruker Daltonics» MALDI-TOF mass-spectrometer. *Results.* A number of characteristic features of brucella mass-spectra was detected: in particular, preservation of the total qualitative composition of protein profiles of cultures and significant differences in the intensity of separate peaks depending on the nutrient medium used. *Conclusion.* Based on the analysis of the data obtained, use of Albimi agar as the nutrient medium for preparation of brucella culture samples for mass-spectrometric analysis was shown to be optimal.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 29—34

Key words: mass-spectrometry, protein profiling, brucellosis causative agent

## ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез — зоонозное инфекционно-аллергическое заболевание, склонное к хроническому течению, вызываемое микроорганизмом рода *Brucella*. По данным Роспотребнадзора в Российской Федерации в 2014 году было зарегистрировано свыше 400 случаев впервые выявленного бруцеллеза среди людей, наиболее часто на территории СКФО, республик Дагестан и Тыва [3].

В схему лабораторной диагностики бруцеллеза входят бактериологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы [2], позволяющие идентифицировать и дифференцировать бруцеллы до вида и биовара. В настоящее время наряду с традиционными методами идентификации патогенов получили распространение физико-химические методы анализа, базирующиеся на количественном измерении физических свойств веществ и характеризующиеся высокой автоматизацией, скоростью и простотой исследований [5].

Один из современных методов идентификации бактерий — времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS), основанная на исследовании специфичных белковых профилей отдельных микроорганизмов [11]. Получение специфичных масс-спектров штаммов возбудителя бруцеллеза дает основание для эффективного применения MALDI-TOF в целях быстрой идентификации патогена. Однако, несмотря на широкие потенциальные возможности использования этого подхода для идентификации и типирования микроорганизмов и, в частности, возбудителя бруцеллеза, на данный момент отсутствуют стандартные процедуры выполнения анализа, нет единого протокола подготовки проб при идентификации бруцелл.

При культивировании бруцеллезного микроба клетки высевают на различные питательные среды: печеночный и мясо-печеночный с добавлением глицерина (2%) и глюкозы (1%) агар, сывороточно-декстрозный, картофельно-сывороточный, триптикозно-соевый, триптозный и кровяной агары в аэробных условиях при температуре 37°С в нейтральной среде (рН 6,8 — 7,2). Потребность бруцелл в источнике азота и дополнительных факторах роста обеспечивается при наличии в питательном субстрате аминокислот: глутаминовой, L-аланина, лизина, метионина, гистидина, цистеина, а также комплекса витаминов группы В (В1, В2, В6) и никотиновой кислоты [4]. Вследствие того, что бруцеллы характеризуются при культивировании относительно медленным ростом, рекомендовано использовать селективные питательные среды, обеспечивающие ингибирование или уменьшение числа колоний остальных микроорганизмов, особенно в загрязненных образцах или в образцах, содержащих очень небольшое число жизнеспособных клеток возбудителя бруцеллеза.

В ряде научных публикаций сообщается о существенном влиянии условий культивирования микроорганизмов на характеристики полученных масс-спектров [9, 10]. Поэтому одним из актуальных направлений научного поиска остается изучение зависимости результатов идентификации от условий культивирования штаммов возбудителя бруцеллеза, таких как качество питательной среды, время роста и др.

Цель работы — оценить влияния культивирования бруцелл на различных средах на MALDI-TOF масс-спектрометрические профили экстрактов выращенных штаммов, полученных с использованием стандартизированной процедуры пробоподготовки.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы вакцинные штаммы бруцелл: *Brucella melitensis* Rev-1 и *Brucella abortus* 19ВА из коллекции Ставропольского противочумного института. Вода ультрачистая (тип I по ASTM) (система Millipore, США); спирт этиловый 96% (ГОСТ Р 51723-2001); кислота муравьиная, ~ 98% (Sigma-Aldrich, США); ацетонитрил (степень чистоты «для ВЭЖХ-МС») (Sigma-Aldrich, США);  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота (степень чистоты для масс-спектрометрии) (Sigma-Aldrich, США); трифторуксусная кислота, >99% (Sigma-Aldrich, США); бактериальный тест-стандарт МВТ (Bruker Daltonics, Германия). Коммерческие стандартизированные питательные среды: бруцеллагар (ГНЦ ПМБ), показатели качества: рН 7,0 — 7,2, прочность 310 — 390 г по Валенту, содержание аминного азота 120 — 130 мг %; эритрит-агар (НПО «Микроген»), показатели качества: рН 7,0 — 7,4, прочность 310 — 390 г по Валенту, содержание аминного азота 90 — 100 мг %; агар Альбими (Ставропольский противочумный институт), изготовлен из коммерчески доступных стандартных компонентов, показатели качества: рН 7,2 — 7,4, прочность 300 — 380 г по Валенту, содержание аминного азота 100 — 120 мг %).

Вследствие нестабильности свойств плотных питательных сред разных серий, приготовленных по одному и тому же рецепту, большое значение имеет их контроль по физико-химическим показателям: прозрачность и цветность, кислотность, содержание хлоридов и аминного азота, стерильность, температура плавления студня среды, температура застудневания среды, плотность студня среды. Кроме того, стандартность питательных сред обеспечивается комплексом контрольных процедур, включающих использование контрольных штаммов микроорганизмов, позволяющих сделать заключение о пригодности испытуемых сред для проведения бактериологических исследований.

Процедура предварительной проверки питательной среды: из 2-суточных культур *B. melitensis* и *B. abortus* готовили по 20 мкл суспензии в концентрации

200 м.к./мл (по стандартному образцу мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича) для посева на 4 чашки. Через 5 суток культивирования при 37°C на 1 чашке Петри в среднем выросло 10 — 100 колоний бруцелл, что свидетельствовало о кондиционности тестируемых сред. Для скашивания агар располагали в наклонном положении, после его застывания выдерживали в течение 5 — 7 суток при комнатной температуре и использовали для выращивания бруцелл.

При I пассаже вносили в ампулу с лиофилизированной культурой пастеровской пипеткой 0,4 мл питательного бульона, перемешивали до получения однородной микробной взвеси и этой же пипеткой засеивали на чашку Петри с питательным агаром (толщина слоя  $6 \pm 0,5$  мм), посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Затем, культуру I пассажа высевали в пробирки со скошенным агаром, инкубировали при 37°C 48 ч. В качестве инокулята использовали одну бактериологическую петлю ( $d=2$  мм) из суспензии культуры первой генерации, приготовленной 10-кратным разведением путем последовательного переноса 0,5 мл взвеси культуры в пробирки с 4,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Взвесь культуры второй генерации доводили, используя стерильный 0,9% раствор натрия хлорида, до оптической плотности, соответствовавшей  $1,0 \times 10^9$  м.к./мл (по стандартному образцу мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича), затем десятикратными разведениями — до  $1 \times 10^6$  м.к./мл.

Обеззараживание проб культур возбудителя бруцеллеза проводили путем обработки раствором 70% этилового спирта по ранее описанной методике [7], в которую в ходе исследования были внесены незначительные модификации. Белковые экстракты для MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа получали посредством обработки обеззараженных проб 70% раствором муравьиной кислоты.

Регистрацию масс-спектров осуществляли в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия) при следующих параметрах: частота лазера 60 Hz, интенсивность лазера 10 — 50%, 110 нс P1E, напряжение 1 источника ионов 19,4 kV, 2 — 17,3 kV, напряжение линзы 8 kV, напряжение линейного детектора 2,500 kV, рабочий диапазон масс 2000 — 20000 Da. При подборе условий получения каждого одиночного спектра использовали 40 импульсов лазера (частота 60 Hz) для обеспечения оптимальной чувствительности детектирования компонентов образцов. Суммарный масс-спектр генерировали из 10 случайно выбранных позиций каждой капли мишени (всего по 4000 выстрелов лазера). Каждая серия анализов сопровождалась внутренней калибровкой с использованием бактериального тест-стандарта MBT. Формирование масс-спектров проводили в программах Daltonics flexControl v 3.3.64 (Bruker Daltonics, Германия), визуализацию и предварительный анализ полученных масс-спектров проводили в программе flexAnalysis v 3.3.65 (Bruker Daltonics, Германия).

Для математико-статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica v 10.0 (Statsoft Inc., США). Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения ( $M$ )  $\pm$  стандартное отклонение ( $SD$ ). Анализ групповых различий оценивали по t-критерию Стьюдента для несвязанных выборок при 95% уровне значимости. Различия между выборками считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования проведен MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ белковых экстрактов вакцинных штаммов бруцелл *B. melitensis* Rev-1 и *B. abortus* 19VA, полученных на агаре Альбими, бруцеллагаре и эритрит-агаре. Всего было зарегистрировано 630 масс-спектров (по 20 масс-спектров каждого белкового экстракта), наиболее репрезентативные из полученной коллекции были отобраны для проведения сравнительного анализа полученных данных.

Воспроизводимость результатов анализа была подтверждена путем исследования пяти культур каждого штамма, выращенных в стандартных условиях на каждой из выбранных питательных сред. При проведении сравнительного анализа соответствующих белковых экстрактов, полученных в одинаковых условиях, изменений качественного состава масс-спектров не выявлено. Данные белкового профилирования штаммов возбудителя бруцеллеза в целом согласуются с результатами более ранних работ [6]. Необходимо отметить, что рибосомальные белки, относящиеся к белкам домашнего хозяйства, присутствуют в большом количестве в цитоплазме клетки, их набор остается неизменным вне зависимости от внешних условий и стадии роста [1]. Вероятность присутствия экзогенных белков, в том числе из питательной среды, в исследованных образцах не оказывает влияния на результаты белкового профилирования, вследствие особенностей пробоподготовки (экстракция фракции основных белков, анализ сигналов в диапазоне масс 2 — 20 kDa).

Сравнительный анализ пиков на спектрах бруцелл позволил выявить ряд особенностей. Общее число идентифицированных пиков на масс-спектрах для штамма *B. melitensis* Rev-1, культивированных на агаре Альбими, бруцеллагаре и эритрит-агаре, составило  $77 \pm 3$ ;  $65 \pm 5$  и  $41 \pm 4$  соответственно. Для штамма *B. abortus* 19VA при использовании вышеуказанных питательных сред суммарное количество сигналов составило  $96 \pm 5$ ;  $89 \pm 4$  и  $52 \pm 4$  соответственно.

Наиболее представительные по числу сигналов масс-спектры были отмечены для белковых экстрактов бруцелл, полученных на агаре Альбими, что обусловлено, на наш взгляд, оптимальным количественным соотношением азота и углерода, обеспечивающих максимальный ростостимулирующий эффект клеток бактерий.

Анализ масс-спектров белковых экстрактов штаммов возбудителя бруцеллеза, выращенных в течение 12, 48, и 72 ч на каждой из тестируемых питательных сред, позволил установить влияние времени инкубации на характер получаемых данных. Интенсивность мажорных сигналов на масс-спектрах штаммов бруцелл, собранных спустя 48 ч (окончание экспоненциальной фазы роста [8]), была максимальной. При сравнительном анализе спектров экстрактов культур после 12 ч инкубации (латентная фаза) наблюдалось снижение интенсивности (на  $40 \pm 5\%$ ) анализируемых пиков. Однако на масс-спектрах бруцелл, отобранных через 72 ч (завершение стационарной фазы роста), интенсивность сигналов не изменялась, что, возможно, вызвано переходом популяции в фазу замедления роста, сопровождающуюся истощением питательных веществ с характерным сокращением метаболической активности.

Абсолютная интенсивность мажорных пиков на полученных масс-спектрах в случае использования агара Альбими составила: (a.i.)  $35\ 187 \pm 530$ ;  $48\ 698 \pm 435$ ;  $54\ 751 \pm 560$ , что существенно превосходит аналогичные сигналы для исследуемых образцов белковых экстрактов с использованием бруцеллагара ( $13\ 810 \pm 240$ ;  $15\ 035 \pm 310$ ;  $13\ 845 \pm 295$  соответственно) и эритрит-агара ( $11\ 281 \pm 150$ ;  $11\ 692 \pm 220$ ;  $12\ 877 \pm 200$  соответственно). Таким образом, белковые профили экстрактов культур бруцелл, выращенных на агаре Альбими, характеризовались максимальной интенсивностью специфичных пиков.

Исследуемые спектры возбудителя бруцеллеза содержали общий набор из 17 сигналов в интервале масс 2000 — 20000 Da, отличающихся по интенсивности ( $m/z \pm 5$  Da): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16 068.

Сравнительный анализ групп специфичных пиков на полученных масс-спектрах позволил установить стабильность их состава в белковых портретах бруцелл независимо от используемой питательной среды, что, в свою очередь, подтверждает предположение о консервативности состава основных белков воз-

будителя в исследуемом диапазоне. При этом экспериментально было установлено, что относительная интенсивность отдельных сигналов белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза напрямую зависит от свойств питательной среды.

Полученные в ходе исследования результаты в целом позволяют сделать вывод о том, что применение агара Альбими в качестве питательной среды при культивировании бруцелл для масс-спектрометрического анализа является оптимальным.

Необходимо отметить, что использование регламентированных методик обеззараживания и подготовки проб культур патогенных микроорганизмов, в том числе стандартизованных питательных сред, позволит обеспечить необходимый уровень достоверности и воспроизводимости результатов масс-спектрометрического анализа, что имеет большое значение, учитывая широкое внедрение технологии MALDI-TOF MS в лабораторную практику.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Демидов Е.А., Старостин К.В., Попок В.М., Пельтек С.Е. Применение малди время-пролетной масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013, 17 (4/1): 758-764.
2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство. Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. М., Шико, 2013.
3. Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2014 г. и прогноз на 2015 г. Пробл. особо опасных инфекций. 2015, 2: 22-24.
4. Методические указания МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза».
5. Charnot-Katsikas A., Tesic V., Boonlayangoor S. et al. Prospective evaluation of the VITEK MS for the routine identification of bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory: assessment of accuracy of identification and turnaround time. J. Med. Microbiol. 2014, 63 (2): 235-241.
6. Ferreira L., Castaño S. V., Sánchez-Juanes F. et al. Identification of Brucella by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. PLoS One. 2010, 5 (12): 1-8.
7. Lista F., Reubsaet F., De Santis R. et al. Reliable identification at the species level of Brucella isolates with MALDI-TOF-MS. BMC Microbiol. 2011, 11: 267.
8. Murthy R.V., Arora J.S., Kumar B.V.S. Comparative proteome analysis of Brucella abortus under different growth conditions by two dimensional electrophoresis. IJAR. 2015, 3 (2): 795-800.
9. Ruelle V., El Moualij B., Zorzi W. et al. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2004, 18 (18): 2013-2019.
10. Valentine N., Wunschel S., Wunschel D. et al. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71 (1): 58-64.
11. Van Veen S.Q., Claas E.C.J., Kuijper Ed J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J. Clin. Microbiol. 2010, 48 (3): 900-907.

*Поступила 15.08.15*

Контактная информация: Ульшина Диана Васильевна,  
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-12

Ю.В.Останкова<sup>1</sup>, А.В.Семенов<sup>1</sup>, Н.А.Стойнова<sup>1</sup>, Н.К.Токаревич<sup>1</sup>,  
Н.Е.Любимова<sup>1</sup>, О.А.Петрова<sup>1</sup>, Ю.В.Ананьина<sup>2</sup>, Е.М.Петров<sup>2</sup>

## ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *LEPTOSPIRA SPP.* НА ОСНОВЕ 16S рРНК

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

*Цель.* Сравнительное типирование коллекции штаммов *Leptospira spp.* на основе анализа 16S фрагмента РНК. *Материалы и методы.* Для ПЦР использовали две пары праймеров, совместно фланкирующих фрагмент размером 1423 п.о. Для филогенетического анализа были использованы последовательности штаммов 16S рРНК *Leptospira spp.*, представленные в международной базе данных. *Результаты.* Показано высокое сходство, в том числе межвидовое, 16S фрагмента у штаммов *Leptospira spp.*, независимо от источника получения, серовара и серогруппы. Обсуждаются гетерогенность первичной матрицы, спонтанные мутации горячих точек и ошибочные спаривания нуклеотидов, характерные для 16S последовательности патогенных штаммов *Leptospira spp.* Получена молекулярно-генетическая характеристика некоторых референсных штаммов *Leptospira spp.* по 16S последовательности. *Заключение.* Результаты исследований свидетельствуют о целесообразности введения в клиническую практику идентификацию штаммов *Leptospira spp.* по 16S последовательности непосредственно из клинического материала, что позволит значительно сократить время идентификации, отказаться от сложных типоспецифических сывороток и иных трудоемких методов.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 35—39

Ключевые слова: лептоспироз, зооантропонозы, 16S РНК секвенирование

Yu.V.Ostankova<sup>1</sup>, A.V.Semenov<sup>1</sup>, N.A.Stoyanova<sup>1</sup>, N.K.Tokarevich<sup>1</sup>,  
N.E.Lyubimova<sup>1</sup>, O.A.Petrova<sup>1</sup>, Yu.V.Ananina<sup>2</sup>, E.M.Petrov<sup>2</sup>

## TYPING OF *LEPTOSPIRA SPP.* STRAINS BASED ON 16S rRNA

<sup>1</sup>Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg; <sup>2</sup>Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

*Aim.* Comparative typing of *Leptospira spp.* strain collection based on analysis of 16S RNA fragment. *Materials and methods.* 2 pairs of primers were used for PCR, that jointly flank 1423 b.p. sized fragment. Sequences of *Leptospira spp.* strain 16S rRNA, presented in the international database, were used for phylogenetic analysis. *Results.* A high similarity, including interspecies, of the 16S fragment in *Leptospira spp.* strains was shown independently of the source, serovar and serogroup. Heterogeneity of the primary matrix, spontaneous mutations of hotspots and erroneous nucleotide couplings, characteristic for 16S sequence of pathogenic *Leptospira spp.* strains, are discussed. Molecular-genetic characteristic of certain reference *Leptospira spp.* strains by 16S sequence is obtained. *Conclusion.* Results of the studies give evidence on expedience of introduction into clinical practice of identification of *Leptospira spp.* by 16S sequence directly from the clinical material, that would allow to significantly reduce identification time, dismiss complex type-specific sera and other labor-intensive methods.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 35—39

Key words: leptospirosis, zoo anthroponoses, 16S RNA sequencing