

Цель работы заключалась в оценке схемы MLVA-типирования на соответствие основным критериям типирования возбудителя бруцеллеза до уровня штаммовой дифференциации.

В работе были использованы 26 штаммов бруцелл трех основных патогенных видов (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*), представленных 14 известными референтными, двумя вакцинными, восемью полевыми штаммами и двумя австралийскими изолятами, выделенными от мышевидных грызунов Австралии, имеющими неясное таксономическое положение.

Схема MLVA-типирования включала анализ переменных тандемных повторов штаммов бруцелл в ПЦР с праймерами, ограничивающими 9 VNTR-локусов из обеих панелей (мини- и микросателлитная) MLVA-15.

Референтные и вакцинные штаммы бруцелл с известными генотипами использовали для подтверждения стабильности сохранения количества повторов в анализируемых локусах и оценки воспроизводимости MLVA специфических штаммовых генотипов, стабильности тандемных повторов в анализируемых локусах и соответствия фенотипическим методам анализа.

Для решения этой задачи полученные MLVA генотипы на основе сиквенсного анализа для лабораторных референтных (15) и вакцинных (2) штаммов сравнивали с одноименными штаммовыми генотипами, представленными в международных базах данных. Для 13 штаммов результаты сравнения показали идентичность MLVA генотипов со стабильным наследованием тандемных повторов в анализируемых локусах. Воспроизводимость результатов MLVA-типирования для этих штаммов не зависела от интенсивности проводимых лабораторных пересевов или длительности хранения штаммов.

С другой стороны, было установлено, что три референтных штамма *B. melitensis* 16M (по всем 9 локусам), *B. suis* Thomsen, *B. abortus* 292 (по 7 локусам) и

вакцинный штамм *B. melitensis* Rev-1 (по 8 локусам) имели MLVA генотипы, не соответствующие представленным в международной базе данных. Эти штаммы также не отвечали результатам детальной фенотипической идентификации, что мы объясняем их исходным несоответствием и возможным загрязнением при пересевах и хранении.

Дендрограмма, построенная с использованием программного обеспечения SAS JMP 8 версии, на основе данных MLVA-9 типирования 26 изолятов выявила генетически родственный кластер, составленный из полевых штаммов *B. melitensis* C-457, 548, 565 вместе с референтным штаммом *B. melitensis* 63/9 второго биовара. Этот кластер при сравнении с Международной MLVA систематикой показывал наибольшее родство со Средиземноморским восточным генотипом 45, что согласуется с ранее полученными Ю.К. Кулаковым и др. данными о циркуляции изолятов этого генотипа как на территории России, так и в приграничных государствах.

Полевые штаммы *B. abortus* 1552, A-422 группировались в родственный кластер вместе с большинством референтных штаммов вида *B. abortus*.

Штамм *B. suis* 6 попал в кластер вместе с референтными штаммами *B. suis* 1–4 биоваров, а штамм *B. suis* 3–4 – с референтным штаммом *B. suis* 5 биовара.

Австралийские штаммы *Brucella* 83-4, 83-6 формировали общий, но удаленный от других штаммов бруцелл кластер.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что MLVA-типирование, проведенное по девяти локусам, позволяет систематизировать штаммы бруцелл в соответствии с существующим таксономическим положением видов бактерий рода *Brucella*. В то же время подтверждение более тонких дискриминационных возможностей данной системы генотипирования требует проведения дальнейших исследований.

## АДАПТАЦИЯ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПИРОЗА И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ЛЕПТОСПИРОЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

А.Н. Ваганова, Н.А. Стоянова, Н.К. Токаревич

ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург

Лептоспироз – инфекционное заболевание, тяжело протекающее у человека и поражающее ряд млекопитающих, в том числе домашних и сельскохозяйственных животных, для которых часто характерно бессимптомное течение. Лептоспирозная инфекция характеризуется разнообразными клиническими проявлениями, в связи с чем необходимо лабораторное подтверждение диагноза. Актуальной проблемой является также разработка доступных методов для скрининговых исследований на носительство лептоспир у животных.

«Золотым стандартом» диагностики лептоспироза является реакция микроагглютинации (РМА), требующая наличия живых культур лептоспир, с чем свя-

зана ее трудоемкость. Результаты РМА, свидетельствующие о лептоспирозной инфекции, могут быть получены, как правило, на второй неделе заболевания и в ряде случаев диагноз может быть поставлен только на основании повторного исследования сыворотки с интервалом в несколько дней. Антитела к лептоспирам, выявляемые в РМА, могут длительно сохраняться после перенесенного заболевания и вакцинации, что усложняет интерпретацию результата.

Доказательством лептоспирозной этиологии заболевания является обнаружение возбудителя в организме хозяина. Применяемые для этих целей классические микробиологические методы исследования обладают

рядом недостатков, таких как низкая чувствительность микроскопии и длительность проведения бактериологического исследования, связанная с тем, что лептоспиры относятся к микроорганизмам, медленно растущим на питательных средах. Указанные ограничения лабораторной диагностики лептоспироза могут быть преодолены при внедрении молекулярно-биологических методов, характеризующихся более высокой чувствительностью по сравнению с микроскопией и позволяющих быстро (в течение нескольких часов) получить ответ.

Метод ПЦР позволяет исследовать на присутствие лептоспир сыворотку, мочу, внутриглазную жидкость и биоптаты различных органов. В настоящее время большая часть тест-систем для детекции лептоспир методом ПЦР рассчитана на выявление возбудителей в сыворотке. Однако немаловажное значение имеет выявление лептоспир в моче, необходимое как для адекватной диагностики, так и для контроля лечения лептоспироза у людей и животных, поскольку к концу первой недели заболевания происходит резкое снижение содержания возбудителя в крови, что связано с выработкой специфических антител в организме хозяина. Персистенция лептоспир в почках как при острой, так и при хронической инфекции сопровождается выделением лептоспир с мочой. Важна также адаптация метода для выявления лептоспир в полевом материале, поскольку обнаружение лептоспир в органах животных, отловленных в местах их обитания, необходимо для контроля распространения лептоспирозной инфекции.

Целью исследования является разработка тест-системы для детекции лептоспир в биологическом материале и оценка ее чувствительности и специфичности.

В качестве генетической мишени был выбран ген *colA*, продуктом которого является микробная коллагеназа. Анализ структуры данного гена с использованием алгоритма BLAST показала, что наиболее близкие по структуре коллагеназы характерны для представителей рода *Bacillus*, однако в этом случае сходство не превышает 47 %. Сходство последовательности между видами патогенных лептоспир составляет 88 %, в то время как у сапрофитных лептоспир данного гена не найдено. Праймеры были подобраны к консервативным, специфическим для лептоспир, участкам данного гена. Длина амплифицируемого участка составляет 447 п.н. Сравнение структуры праймеров с коллекцией последовательностей GenBank показало, что полностью комплементарны оба праймера только последовательности гена *colA*, характерной для патогенных лептоспир, что теоретически исключало неспецифический результат при ПЦР с препаратами ДНК из образцов различной природы.

Разработанная система была оптимизирована для проведения реакции в режиме стандартной ПЦР с последующей визуализацией полученных ампликонов методом электрофореза в агарозном геле. Для подтверждения специфичности данных праймеров было проведено исследование из взаимодействия с препаратами ДНК патогенных лептоспир различных видов (*L.interrogans*, *L.kirschneri*, *L.borgpetersenii* и *L.noguchii*). При проведении реакции с ДНК всех положительных образцов произошло образование специфического ампликона. В отрицательных контрольных образцах на-

копления продуктов реакции не наблюдалось. Также не было отмечено взаимодействие с ДНК сапрофитных лептоспир.

Чувствительность ПЦР с использованием разработанных праймеров оценивалась путем проведения реакции на препаратах ДНК, выделенных из образцов мочи и сыворотки людей, не больных лептоспирозом, контаминированных лептоспирами в лабораторных условиях. Были протестированы разведения, содержащие  $10^5$  – 50 клеток лептоспир на мл. Выделение ДНК проводилось из объема 1 мл мочи и 0,1 мл сыворотки. Установлено, что чувствительность данных праймеров составляет 2 геномных эквивалента на аликвоту ДНК препарата (50 клеток на мл). В то же время не было отмечено образование неспецифических продуктов реакции.

Специфичность праймеров была оценена при исследовании десяти образцов мочи людей, не болевших лептоспирозом, и пяти образцов мочи собак, перенесших лептоспироз и получивших антибиотикотерапию, приведшую к элиминации патогена. Во всех случаях не наблюдалось неспецифического взаимодействия праймеров с ДНК, выделенной из анализируемого материала.

Для подтверждения того, что в реакции происходит амплификация специфического фрагмента генома лептоспир, было проведено секвенирование ампликонов, полученных в реакции ПЦР, с разработанными праймерами на матрице ДНК штамма *Perrepelecin* – эталонного штамма серогруппы *Tarassovi*, принадлежащего к виду *L.borgpetersenii*. При анализе полученной последовательности с использованием алгоритма BLAST было установлено, что она соответствует участку генома, являющегося мишенью разрабатываемой тест-системы. Структура ампликонов штамма *Perrepelecin* имеет более высокий уровень сходства с аналогичной последовательностью в геноме лептоспир вида *L.borgpetersenii* (сходство последовательностей 95 %), к которому принадлежит данный штамм, чем со сходной последовательностью в геноме лептоспир вида *L.interrogans* (сходство последовательностей 24 %).

Исследование мочи пяти собак, больных лептоспирозом, до начала антибиотикотерапии показало наличие лептоспир в образцах. Лептоспирозная этиология инфекции была подтверждена положительными результатами РМА, однако в трех случаях титр антител не превышал 1:200, то есть был сопоставим с титром, который может наблюдаться после вакцинации.

Для оценки возможности применения разработанной системы в эпидемиологическом надзоре за очагами лептоспирозной инфекции было проведено исследование полевого материала. Всего было исследовано 89 особей грызунов и насекомоядных различных видов, пойманных на территории г. Санкт-Петербурга, в том числе *Apodemus agrarius* – 56 особей, *Apodemus uralensis* – 7, *Microtus arvalis* – 6, *Sorex araneus* – 20. Для исследования отбирались печень и почки. ДНК патогенных лептоспир обнаружена у 4,5 % исследованных животных (*M.arvalis* – 2 особи, *A.uralensis* – 1 особь, *S.araneus* – 1 особь).

Таким образом, разработанная тест-система обладает достаточным уровнем чувствительности, позволяет в короткие сроки проводить исследование

биологического материала различной природы на наличие патогенных лептоспир. Данная диагностическая система может быть использована для диагностики лептоспироза у людей и животных, выявления леп-

тоспиросительства у животных и контроля эффективности лечения, а также получения данных о наличии патогенных лептоспир в полевом биологическом материале.

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ЗООНОЗНОГО САЛЬМОНЕЛЛЕЗА НА ЮГЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Ф.Н. Шубин, Н.А. Кузнецова, А.В. Раков, О.Ю. Якунина  
НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, г. Владивосток,  
ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области»,  
ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Томской области»,  
ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области»

В современных условиях эпидемиологический надзор получил возможность использовать достоверные сведения о генетическом родстве циркулирующих штаммов возбудителей инфекций путем применения молекулярно-генетических методов внутривидового типирования микроорганизмов. При этом методы различаются по их воспроизводимости, дифференцирующей способности, сложности интерпретации результатов и трудоемкости. Нашими исследованиями обоснована целесообразность создания системы централизованного микробиологического молекулярно-генетического мониторинга за сальмонеллами, основанного на данных плазмидного анализа микроба.

Изучение молекулярной эпидемиологии сальмонеллеза в Приморском крае позволило раскрыть основные закономерности развития эпидемического процесса сальмонеллезной инфекции, вызванного гетерогенной популяцией *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*).

Актуальность исследований, направленных на изучение характеристики популяций сальмонелл на других административных территориях Дальнего Востока, определяется, с одной стороны, их неизученностью, а с другой – их значимостью для цельного понимания молекулярной эпидемиологии сальмонеллеза и профилактики инфекции.

**Цель исследования** – изучение плазмидной характеристики популяций сальмонелл в Новосибирской, Томской и Омской областях и закономерностей развития эпидемического процесса среди населения, вызванного гетерогенной популяцией возбудителя сальмонеллеза.

**Материалы и методы исследования.** Изучена плазмидная характеристика у 1246 штаммов *S. enteritidis*, выделенных в 2005–2010 гг. в Новосибирской, Томской и Омской областях из различных экологических источников, в том числе от 961 больного сальмонеллезом при спорадической заболеваемости, от 216 человек во время вспышек болезни и из 69 проб продукции предприятий промышленного птицеводства, в том числе из мяса кур, субпродуктов, полуфабрикатов. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента. Внутривидовое типирование штаммов *S. enteritidis* выполнено методом плазмидного анализа бактерий.

**Результаты и обсуждение.** Плазмидный анализ штаммов *S. enteritidis*, изолированных в указанных областях в 2006–2010 гг. от 961 больного при спорадической заболеваемости (табл. 1), показал, что по плазмидным характеристикам популяции микроба в каждой из областей гетерогенны и представлены 34 плазмидными типами. При этом штаммы микроба, выделенные от больных, дифференцированы на две группы: основные и редко выявляемые. Первая из них включала штаммы девяти плазмидных типов, на долю которых пришлось 91,2 % культур, и они изолированы от 876 больных.

В соответствии с частотой выделения от больных среди основных плазмидных типов выделен явно доминирующий тип, маркированный плазмидами 38:1,4 Mda, на долю которого пришлось 49,5 % штаммов микроба. Вторыми по частоте встречаемости были два плазмидных типа микроба 38 Mda и 38:2,6:1,4 Mda, каждый из которых выявлен соответственно у 12,8 и 8,6 % больных. Частота выделения от больных остальных плазмидных типов *S. enteritidis*, отнесенных в группу основных, была значительно ниже, а редко выявляемые типы не имели сколько-нибудь существенной этиологической значимости в заболеваемости населения.

Частота выделения от больных в различных областях Западной Сибири основных плазмидных типов *S. enteritidis* неоднозначна. Среди представленных трех областей наиболее близкая плазмидная характеристика *S. enteritidis* в Новосибирской и Томской области. Из выявленных на территории областей 33 плазмидных типов микроба 14 являются общими для обеих территорий, а основная часть заболеваемости обеспечивается участием трех типов микроба 38 Mda, 38:1,4 Mda и 38:2,6:1,4 Mda, на долю которых приходится свыше 70 % больных. Напротив, популяция микроба у больных в Омской области имеет существенные отличия. Прежде всего, среди штаммов микроба, выделенных от больных, не дифференцируется доминирующий плазмидный тип, а у 72,8 % заболевших выявлены штаммы *S. enteritidis* плазмидных типов 38 Mda, 38:1,4 Mda и 38:2,3 Mda, при этом микроб последнего плазмидного типа не играет существенной роли в этиологии сальмонеллеза в Новосибирской и Томской области.