

Е.В.Найденова, С.А.Портенко, Е.С.Казакова, И.Г.Карнаухов, А.В.Черкасов, С.А.Щербакова,  
В.В.Кутырев

## ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОМНОГО АНАЛИЗА В УСЛОВИЯХ МОБИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА СПЭБ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,  
Российская Федерация

В работе описан первый опыт использования геномного анализа в условиях мобильного комплекса СПЭБ во время проведения XXVII Всемирной летней Универсиады-2013 в Казани. В результате было проведено 16S рРНК секвенирование штамма *Salmonella enterica*, выделенного от больного. Для этого использовали набор «MicroSEQ 500 16S rDNA Bacterial Identification Kits» (Applied Biosystems, США), позволяющий секвенировать фрагменты ДНК (500 пар нуклеотидов) гена 16S рРНК исследуемых бактерий.

*Ключевые слова:* мобильный комплекс СПЭБ, геномный анализ, сальмонеллы.

E.V.Naidenova, S.A.Portenko, E.S.Kazakova, I.G.Karnaukhov, A.V.Cherkasov, S.A.Shcherbakova, V.V.Kutyrev

## Experience in Genome Analysis Use in SAET Mobile Complex Facilities

Russian Research Anti-Plague Institute, Saratov, Russian Federation

Described is the first-ever experience in genome analysis use in SAET mobile complex facilities, obtained during the XXVII World-wide Summer Universiade in Kazan, 2013. Carried out was 16S rRNA sequencing of *Salmonella enteric* strain isolated from an infected. For that matter, employed was “MicroSEQ 500 16S rDNA Bacterial Identification Kits” (Applied Biosystems, USA), which allows for sequencing of DNA fragments (500 bp) of 16S rRNA gene in the bacteria under investigation.

*Key words:* SAET mobile complex, genome analysis, Salmonella.

Новые технологии секвенирования ДНК дают возможность достаточно быстро и с высокой эффективностью определять особенности строения бактериальных геномов, что позволяет выявить некультивируемые или труднокультивируемые формы бактерий, установить таксономическое положение ранее неизвестных микроорганизмов, провести идентификацию выделенных бактериальных штаммов. Это особенно важно при проведении оперативных исследований, выполняемых как в стационарных лабораториях, так и в лабораториях мобильных формирований, в том числе мобильного комплекса СПЭБ РосНИПЧИ «Микроб» (МК СПЭБ).

Во время подготовки и проведения XXVII Всемирной летней Универсиады-2013 в Казани был задействован МК СПЭБ РосНИПЧИ «Микроб» в рамках обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и для усиления лабораторной и противоэпидемической служб. МК СПЭБ оснащен современным оборудованием для проведения диагностических исследований, в том числе и геномного анализа.

В ходе проведения диагностических исследований классическим бактериологическим методом из фекалий от больного с симптомами острой кишечной инфекции был выделен штамм *Salmonella enterica* № 26. Исследуемый материал заседали методом истощения на плотные питательные среды: агар Эндо, висмут-сульфитный агар (ВСА), среда Плоскирева и инкубировали при температуре (37±1) °С до появления видимого роста. В качестве среды обогащения

использовали селенитовый бульон (в соотношении 1:5), через 6 ч инкубации при температуре (37±1) °С проводили высевы на среду Эндо и ВСА. При просмотре посевов отбирали подозрительные колонии, каждую из которых отсеивали на среду Клигlera для учета ферментативных свойств и на скошенный агар Хоттингера (рН 7,2) для изучения биохимических и серологических свойств. Для определения фаголизательности культуры посева производили на чашки с агаром Хоттингера, рН 7,2.

Идентификацию родовой принадлежности по биохимической активности проводили с использованием тест-системы API 20E и ПО APIweb (BioMerieux, Франция). Исследуемый штамм идентифицирован как *Salmonella spp.* с вероятностью 89,0 %. Тест на фаголизательность сальмонеллезным бактериофагом был положительным. Серологическое типирование осуществляли в реакции агглютинации на стекле с моно- и поливалентными О- и Н-сыворотками. Для реакции агглютинации с О-сыворотками культуру отбирали с верхней части скошенного агара, для агглютинации с Н-сыворотками – конденсат с нижней части скошенного агара. Выделенная культура агглютинировалась на ++++ в реакции с поливалентной сывороткой основных групп (А, В, С, D, Е), О-6, О-7, О-9, О-12, О-vi и не агглютинировалась с сыворотками О-1, Н-f, Н-g, Н-m. Полученные результаты не позволили отнести выделенную культуру ни к одной из групп А, В, С, D или Е в соответствии со схемой классификации сальмонелл по Кауффман-Уайта.

Для дальнейшей идентификации выделенного

штамма был применен геномный анализ. С этой целью использовали набор «MicroSEQ 500 16S rDNA Bacterial Identification Kits» (Applied Biosystems, США), который позволяет амплифицировать и секвенировать фрагменты ДНК (500 пар нуклеотидов) гена 16S рРНК исследуемых бактерий. Колонии выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2). ДНК выделяли из изолированных колоний, ресуспендированных в 100 мкл стерильной дистиллированной воды, с использованием набора для выделения «GeneJET PCR Purification Kit» (Fermentas, США) в соответствии с прилагаемым протоколом. Для проведения реакции амплификации использовали стандартный набор «FAST MicroSEQ 500 16S rDNA PCR Kit». Амплификацию проводили в соответствии с инструкцией к набору с помощью амплификатора «БИС112» (НовосибБиоПрибор, Россия). Результаты реакции учитывали методом электрофореза в 2 % агарозном геле. Продукты амплификации очищали набором «CentriSep Column» (Applied Biosystems, США).

Геномный анализ фрагментов амплификации осуществляли с использованием циклического секвенирования по методу Сенгера на амплификаторе «БИС112» (НовосибБиоПрибор, Россия), с последующей очисткой продуктов амплификации на колонках с сефадексом «CentriSep Column» (Applied Biosystems, США), далее полученные образцы анализировали методом капиллярного электрофореза на приборе «ABI-310 PRISM™ Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США).

Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием алгоритма BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) и программного обеспечения MEGA 5.0. В результате работы были получены нуклеотидные последовательности, на 82 % гомологичные 16S рРНК сальмонелл, что позволило идентифицировать полученный штамм как *Salmonella enterica*.

Учитывая, что традиционно применяемая для типирования сальмонелл схема Кауффман-Уайта, основанная на различиях по O-, H- и Vi-антигенам и включающая более 2500 сероваров, требует наличия большого количества дорогостоящих сывороток для серотипирования свежесыведенных штаммов [2, 4], поэтому для идентификации и дифференциации сальмонелл в последние годы используют геномный

анализ [1], в том числе 16S рРНК секвенирование, что позволяет значительно сократить время и трудозатраты при проведении исследований [3].

Идентификация выделенных штаммов классическими бактериологическими методами занимает от 18 до 20 ч. Время проведения анализа методом секвенирования, включая все этапы, составило 9 ч.

Таким образом, впервые в полевых условиях на базе мобильного комплекса СПЭБ были проведены исследования методом геномного анализа, в результате которых проведена идентификация по 16S рРНК штамма *Salmonella enterica*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baddam R., Thong K.L., Avasthi T.S., Shaik S., Yap K.P., Teh C.S., Chai L.C., Kumar N., Ahmed N. Whole-genome sequences and comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from patients with fatal and nonfatal typhoid fever in Papua New Guinea. *J. Bacteriol.* 2012; 194:5122–3.
2. Guibourdenche M., Roggentin P., Mikoleit M., Fields P.I., Bockemühl J., Grimont P.A.D., Weill F.-X. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 2010; 161:26–9.
3. Hellberg R.S., Haney C.J., Shen Y., Cheng C.M., Williams-Hill D.M., Martin W.B. Development of a custom 16S rRNA gene library for the identification and molecular subtyping of *Salmonella enterica*. *J. Microbiol. Methods.* 2012; 91(3):448–58.
4. Hendriksen R.S. A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. 4th Ed. April 2003.

#### References

1. Baddam R., Thong K.L., Avasthi T.S., Shaik S., Yap K.P., Teh C.S., Chai L.C., Kumar N., Ahmed N. Whole-genome sequences and comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from patients with fatal and nonfatal typhoid fever in Papua New Guinea. *J. Bacteriol.* 2012; 194:5122–3.
2. Guibourdenche M., Roggentin P., Mikoleit M., Fields P.I., Bockemühl J., Grimont P.A.D., Weill F.-X. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 2010; 161:26–9.
3. Hellberg R.S., Haney C.J., Shen Y., Cheng C.M., Williams-Hill D.M., Martin W.B. Development of a custom 16S rRNA gene library for the identification and molecular subtyping of *Salmonella enterica*. *J. Microbiol. Methods.* 2012; 91(3):448–58.
4. Hendriksen R.S. A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. 4th Ed. April 2003.

#### Authors:

Naidenova E.V., Portenko S.A., Kazakova E.S., Karnaukhov I.G., Cherkasov A.V., Shcherbakova S.A., Kutyrin V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Найденова Е.В., Портенко С.А., Казакова Е.С., Карнаухов И.Г., Черкасов А.В., Щербаклова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 16.04.14.