

БОНДАРЕВА Ольга Сергеевна

**ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ САПА НА ОСНОВЕ
АНАЛИЗА ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ И ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХ
РЕГИОНОВ ГЕНОМА**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)

Научный руководитель: **Ткаченко Галина Александровна**, кандидат медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты: **Еременко Евгений Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник лаборатории сибирской язвы

Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, старший научный сотрудник лаборатории диагностики особо опасных инфекций

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится **«4» октября 2019 г.** в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert> Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Микшис Наталья Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Сап – зоонозное инфекционное заболевание, характеризующееся септициемией, образованием специфических гранулем, абсцессов в органах и тканях и высокой летальностью. Возбудитель сапа *Burkholderia mallei* принадлежит к роду *Burkholderia* комплексу *pseudomallei*. В естественных условиях сап поражает преимущественно непарнокопытных животных. Заболевание людей носит отчетливый профессиональный характер, возникает при контакте с больными животными у конюхов, ветеринарных и зоотехнических работников. Высок риск заражения сотрудников бактериологических лабораторий, проводящих выделение культур [Никифоров и др., 2005; Dvorak, Spickler, 2008; Van Zandt et al., 2013; Мелиоидоз и сап, 2016].

К середине XX века сап был ликвидирован на территории многих стран мира. Однако за последние 20 лет отмечается тенденция к увеличению частоты эпизоотий данного заболевания на территории Южной Америки, Африки, Западной и Южной Азии, поэтому сап в настоящее время относят к «возвращающимся» инфекциям [Malik et al., 2012; Verma et al., 2014]. Актуальность эпидемиологического мониторинга сапа в Российской Федерации обусловлена возможностью завоза инфекции при импорте инфицированных лошадей, контаминированного корма или инвентаря [Wernery et al., 2009; Илюхин и др., 2014]. Неблагоприятная эпизоотическая обстановка по сапу в Монголии, граничащей с Россией, а также случай сапа, зарегистрированный у лошади в Германии в 2015 году [Kettle et al., 2016], свидетельствуют о потенциальной возможности возникновения вспышки данного заболевания на территории РФ даже при соблюдении всех существующих протоколов эпизоотологического и эпидемиологического надзора. Учитывая, что возбудитель сапа относится к потенциальным агентам биотерроризма, сохраняется угроза возникновения чрезвычайных биологических ситуаций в результате террористических актов с его применением [Онищенко и др., 2003; Gregory et al., 2007]. Необходимость определения генетической характеристики изолята для установления источника и предположительных путей заноса инфекции в случае возникновения вспышки сапа обуславливают актуальность исследований, направленных на внутривидовое типирование *B. mallei*.

Анализ литературных данных показал, что для возбудителя сапа разработаны различные методы типирования. Однако метод мультилокусного сиквенс-типирования оказался неэффективен для *B. mallei*, поскольку обладал низкой дискриминирующей силой, выявив только 2 сиквенс-типа у всех исследуемых штаммов [Godoy et al., 2003]. Другие подходы, несмотря на высокую эффективность, характеризовались или низкой воспроизводимостью (ПЦР с произвольными праймерами), или необходимостью применения специального оборудования, трудоемкостью проведения анализа (макрорестрикционный анализ ДНК с

использованием пульс-электрофореза) [Савченко и др., 2008; Антонов и др., 2010]. В последние годы для анализа штаммов *B. mallei* широко используют полногеномное секвенирование и мультилокусный анализ числа варибельных тандемных повторов (MLVA - Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) [Johnson et al., 2015; U'Ren et al., 2007]. Предложенная зарубежными исследователями схема MLVA показала высокую разрешающую способность и позволила установить источник вспышки сапа в Бахрейне [Scholz et al., 2014]. Учитывая, что использованный авторами набор VNTR-локусов изначально был выбран на основе анализа генома возбудителя мелиоидоза, он нуждается в оптимизации для типирования штаммов *B. mallei*. Одним из перспективных методов является типирование на основе варибельных ампликонов (VAT - Variable Amplicon Typing), или DFR-анализ (DFR – DiFferent Region), который позволил провести внутривидовую дифференциацию близкородственного возбудителя мелиоидоза с высокой дискриминирующей силой [Duangsonk et al., 2006]. Однако для возбудителя сапа данный метод типирования ранее не разрабатывался.

На базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора функционирует Референс-центр по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза [Приказ Роспотребнадзора № 88 от 17.03.2008]. Одним из направлений его деятельности является совершенствование инструментов идентификации и типирования патогенных буркхольдерий. Разработка и внедрение современных молекулярно-генетических методов типирования возбудителя сапа необходимы для осуществления мониторинга сапной инфекции, расследования случаев заболевания или эпизоотий, генетической паспортизации штаммов *B. mallei*, определения эволюционных и филогенетических связей штаммов микроорганизма.

Цель исследования – изучение варибельности генома возбудителя сапа и разработка методических подходов для типирования штаммов *B. mallei* на основе амплификации дифференцирующих регионов генома и мультилокусного анализа числа варибельных тандемных повторов.

Задачи исследования:

1. Поиск варибельных фрагментов ДНК возбудителя сапа, перспективных для внутривидовой дифференциации *B. mallei*, и конструирование на их основе праймеров и флуоресцентно-меченых зондов.
2. Разработка способа типирования штаммов возбудителя сапа на основе амплификации дифференцирующих регионов генома с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов и применение DFR-анализа для внутривидовой дифференциации *B. mallei*.
3. Выбор VNTR-локусов и разработка сокращенной схемы мультилокусного анализа числа варибельных тандемных повторов для внутривидового типирования *B. mallei* и изучения генетического полиморфизма штаммов возбудителя сапа.
4. Оценка эффективности применения разработанных методических подходов на

основе DFR и MLVA для генотипирования штаммов возбудителя сапа.

Научная новизна

Впервые в качестве ДНК-мишеней для типирования *B. mallei* на основе анализа *in silico* выбрано девять фрагментов генома патогена, вариабельно присутствующих у штаммов возбудителя сапа (BmVAT1, BmVAT2, BmVAT3, BmVAT4, BmVAT5, BmVAT6, BmVAT7, BmVAT8, BmVAT9). Для амплификации отобранных локусов сконструированы специфичные олигонуклеотидные праймеры и зонды, меченные флуоресцентными метками.

Разработан способ внутривидового типирования возбудителя сапа на основе детекции DFR-фрагментов методом ПЦР с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, характеризующийся высокой разрешающей способностью, низкой трудоемкостью и быстротой выполнения анализа.

Научная новизна подтверждена десятью патентами на изобретение олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для типирования штаммов *B. mallei* методом амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК: №2474615 (Приоритет 26.01.2012. Оpubл. 10.02.2013. Бюл. №4), №2474616 (Приоритет 26.01.2012. Оpubл. 10.02.2013. Бюл. №4), №2474617 (Приоритет 26.01.2012. Оpubл. 10.02.2013. Бюл. №4), №2474618 (Приоритет 26.01.2012. Оpubл. 10.02.2013. Бюл. №4), №2474619 (Приоритет 26.01.2012. Оpubл. 10.02.2013. Бюл. №4), №2474620 (Приоритет 26.01.2012. Оpubл. 10.02.2013. Бюл. №4); №2478713 (Приоритет 26.01.2012. Оpubл. 10.04.2013. Бюл. №10), №2478714 (Приоритет 26.01.2012. Оpubл. 10.04.2013. Бюл. №10), №2478715 (Приоритет 26.01.2012. Оpubл. 10.04.2013. Бюл. №10); №2551227 (Приоритет 04.03.2014. Оpubл. 20.05.2015. Бюл. №14).

Проанализировано наличие и число повторов в VNTR-локусах в геноме возбудителя сапа и выбраны локусы 933, 3145, 3652, 20, 1217, 2862 с варьирующим числом повторов у штаммов *B. mallei* перспективные для типирования. Разработана сокращенная схема внутривидовой дифференциации возбудителя сапа на основе анализа числа вариабельных тандемных повторов в шести локусах.

При исследовании штаммов возбудителя сапа из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора охарактеризована вариабельность подобранных ДНК-мишеней, подтверждена их перспективность для разработки способов молекулярного типирования *B. mallei* методами DFR и MLVA. Показана взаимосвязь DFR-типов и MLVA-профилей, полученных при помощи разработанных методических подходов, с географическим регионом происхождения большинства штаммов возбудителя сапа.

Теоретическая и практическая значимость

Путем сравнительного анализа *in silico* полногеномных последовательностей штаммов *B. mallei* изучена вариабельность генома возбудителя сапа и получены новые данные о степени гомологии отдельных фрагментов генома у разных штаммов

патогена. Определены консервативные и вариабельные локусы исследуемых геномов *B. mallei* и создана коллекция нуклеотидных последовательностей, в различной степени присутствующих у разных штаммов *B. mallei*, на основе которой выбраны девять DFR-фрагментов для внутривидовой дифференциации возбудителя сапа.

Сконструированы наборы реагентов, предназначенные для проведения внутривидового типирования возбудителя сапа на основе амплификации дифференцирующих регионов генома при исследовании выделенных культур *B. mallei*, и проведены контрольные лабораторные испытания: «Набор реагентов для генотипирования штаммов возбудителя сапа *Burkholderia mallei* методом амплификации дифференцирующих регионов генома (DFR) с электрофоретической детекцией «Амплиген *Burkholderia mallei* DFR-тип-ЭФ» (протокол № 1/18 от 29.06.18), «Набор реагентов для генотипирования штаммов возбудителя сапа *Burkholderia mallei* методом амплификации дифференцирующих регионов генома (DFR) с флуоресцентной детекцией «Амплиген *Burkholderia mallei* DFR-тип-РВ» (протокол № 2/18 от 29.06.18).

По результатам исследований разработаны методические рекомендации: «Генотипирование патогенных буркхольдерий на основе анализа дифференцирующих регионов ДНК» (утверждены директором института 06.11.2013, протокол №9); «Генотипирование патогенных буркхольдерий с использованием мультилокусного анализа количества вариабельных tandemных повторов» (утверждены директором института 06.11.2013, протокол №9); «Алгоритм применения генотипирующих систем для ускоренной внутривидовой дифференциации патогенных буркхольдерий» (утверждены директором института 06.11.2013, протокол №9); «Генотипирование *Burkholderia mallei* с использованием мультилокусного анализа количества вариабельных tandemных повторов и анализа дифференцирующих фрагментов ДНК» (утверждены директором института 30.04.2014, протокол №6).

Разработанные методические подходы используют сотрудники в лабораториях ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и в Референс-центре по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза для изучения и паспортизации штаммов *B. mallei* (акт внедрения от 30.04.2014). С помощью амплификации дифференцирующих регионов генома и мультилокусного анализа числа tandemных повторов определены генетические профили коллекционных штаммов возбудителя сапа, которые дополнили их паспорта. Полученные данные были внесены в электронный каталог геномных портретов патогенных буркхольдерий и электронную базу данных «Коллекционные штаммы патогенных буркхольдерий ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора» (Свидетельство о регистрации № 2017620285 от 07.03.2017).

Материалы диссертации используют сотрудники института в рамках учебных программ по первичной специализации и переподготовке специалистов при

проведении практических занятий и чтении лекций на курсах повышения квалификации, функционирующих на базе отдела подготовки специалистов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 04.09.2017).

Методология и методы исследования. Планирование и проведение исследований осуществляли согласно поставленной цели на основе комплекса методов: бактериологического, биологического, молекулярно-генетических методов (ПЦР, DFR, MLVA, секвенирования) и биоинформационного анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Сконструированные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды обеспечивают специфичную амплификацию выбранных DFR-фрагментов, вариабельно присутствующих у штаммов *B. mallei*, и могут быть использованы для внутривидового типирования возбудителя сапа методом ПЦР с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов.
2. Разработанный методический подход на основе амплификации девяти дифференцирующих регионов генома возбудителя сапа позволяет за короткий срок с высокой разрешающей способностью и воспроизводимостью проводить внутривидовое типирование *B. mallei*.
3. Разработанная схема типирования возбудителя сапа на основе анализа шести VNTR-локусов позволяет выявлять генетический полиморфизм штаммов *B. mallei* и может быть использована для внутривидовой дифференциации патогена с высокой разрешающей способностью.
4. Сочетанное применение разработанных методических подходов на основе DFR- и MLVA-типирования штаммов возбудителя сапа повышает достоверность результатов анализа, позволяет наиболее полно разделить штаммы *B. mallei* и определить регион их происхождения.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов основана на использовании современных научных методов и проведении статистической обработки полученных фактических данных. Все эксперименты проведены в нескольких повторах на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании.

Результаты работы представлены на III научно-практической школе-конференции молодых ученых и специалистов научно исследовательских организаций Роспотребнадзора (Оболensk, 2011), III и X Ежегодных Всероссийских Конгрессах по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2011, 2018), XI Межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» (Саратов, 2012), 70-ой и 72-ой открытых научно-практических конференциях молодых ученых и студентов с международным

участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2012, 2014), VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика - 2014» (Москва, 2014), VII и IX Всероссийских научно-практических конференциях молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Санкт-Петербург, 2015; Иркутск, 2017), XIII Межгосударственной научно-практической конференции «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005г.) до 2016 года» (Саратов, 2016), XIV Межгосударственной научно-практической конференции «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ» (Саратов, 2018), а также на итоговых научно-практических конференциях ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Волгоград, 2012, 2013, 2017, 2018).

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследование. Работа выполнена в лаборатории генодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках плановых НИР: «Идентификация и типирование возбудителей сапа и мелиоидоза на основе принципов полифазной таксономии» 2010-2014 гг. (шифр темы 052-2-10, № гос. регистрации 01201001191), «Рearанжировка геномов патогенных буркхольдерий при изменении условий культивирования и при пассировании в организме экспериментально зараженных животных» 2011-2013 гг. (шифр темы 060-3-11, № гос. регистрации 01201155413), «Разработка новых подходов к диагностике заболеваний, вызываемых патогенными *Burkholderia*, на основе принципов полифазной таксономии. Создание и совершенствование средств индикации и идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза» 2011-2015 гг. (шифр темы 066-6.6-11, № гос. регистрации 01201168596), «Паспортизация коллекционных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора» 2013-2017 гг. (шифр темы 081-3-13, № гос. регистрации 01201351985), «Молекулярно-генетический анализ адаптационной изменчивости патогенных буркхольдерий» 2014-2016 гг. (шифр темы 083-3-14, № гос. регистрации 01201455661), «Конструирование диагностических наборов реагентов и внедрение их в практику для ускоренной диагностики некоторых особо опасных инфекций методом мультилокусной ПЦР» 2016-2019 гг. (шифр темы 086-2-16, № гос. регистрации АААА-А17-117022850059-6). Автором лично проведен анализ литературы, выполнено сравнение геномов возбудителя сапа *in silico*, найдены переменные локусы, сконструированы праймеры и флуоресцентно-меченые зонды для амплификации DFR-локусов, обработаны результаты экспериментальных данных, разработаны способы типирования штаммов возбудителя сапа на основе амплификации дифференцирующих регионов генома и мультилокусного анализа

числа переменных tandemных повторов, оценена генетическая гетерогенность исследуемых штаммов возбудителя сапа, подготовлены статьи, тезисы, оформлены патенты на изобретение. Отдельные этапы работы выполнены совместно с сотрудниками лаборатории генодиагностики, сектора биоинформационного анализа и лаборатории экспериментальных биомоделей.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 22 печатные работы, из них 3 статьи в периодических изданиях из «Перечня рецензируемых научных журналов», рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, и 10 патентов на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 142 страницах текста, состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований (в том числе одной главы с описанием материалов и методов), заключения и выводов. Диссертационная работа иллюстрирована 13 рисунками и 13 таблицами. Список литературы включает 214 библиографических источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. Объектами исследования служили 14 штаммов *B. mallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, нуклеотидные последовательности геномов 29 штаммов *B. mallei*, представленные в генетической базе данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для изучения стабильности VNTR-локусов использовали субпопуляции штаммов *B. mallei*, полученные после заражения белых мышей, а также 14 штаммов *B. mallei*, длительно культивированных в лабораторных условиях. Используемые в работе штаммы по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам были типичными представителями *B. mallei*. Все работы со штаммами возбудителя сапа осуществляли в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13, МУ 1.3.2569-09, МУ 4.2.2831-11.

Тотальную ДНК штаммов *B. mallei* выделяли с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия) в соответствии с инструкцией. Постановку ПЦР проводили на термоциклере «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия), при гибридационно-флуоресцентном учете результатов использовали амплификатор в «реальном времени» DTlite (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия). Для определения нуклеотидной последовательности ампликонов и проведения фрагментного анализа продуктов амплификации VNTR-локусов использовали автоматический генетический анализатор «ABI 3130 Genetic Analyzer» («Applied Biosystems», США).

Сравнение геномов штаммов возбудителя сапа и поиск переменных нуклеотидных последовательностей генома *B. mallei* осуществляли с помощью программы MAUVE 2.3.1 [Darling et al., 2010]. Для выбора и проверки олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов использовали

программы UGENE v.1.5 («Unipro», Россия), Vector NTI Express v.1.1.2 («Life Technologies», США), Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu>). Гомологию последовательностей проверяли онлайн с использованием алгоритма BLASTn.

Кластерный анализ проводили в программе TreeCon for Windows v.1.3b методом Neighbor-Joining с коэффициентом генетической дистанции M. Nei и W.H. Li. Степень варибельности локусов определяли с помощью индекса разнообразия [Adair et al., 2000]. Для оценки дискриминирующей способности метода использовали индекс Хантера-Гастона (HGDI) [Hunter, Gaston, 1988].

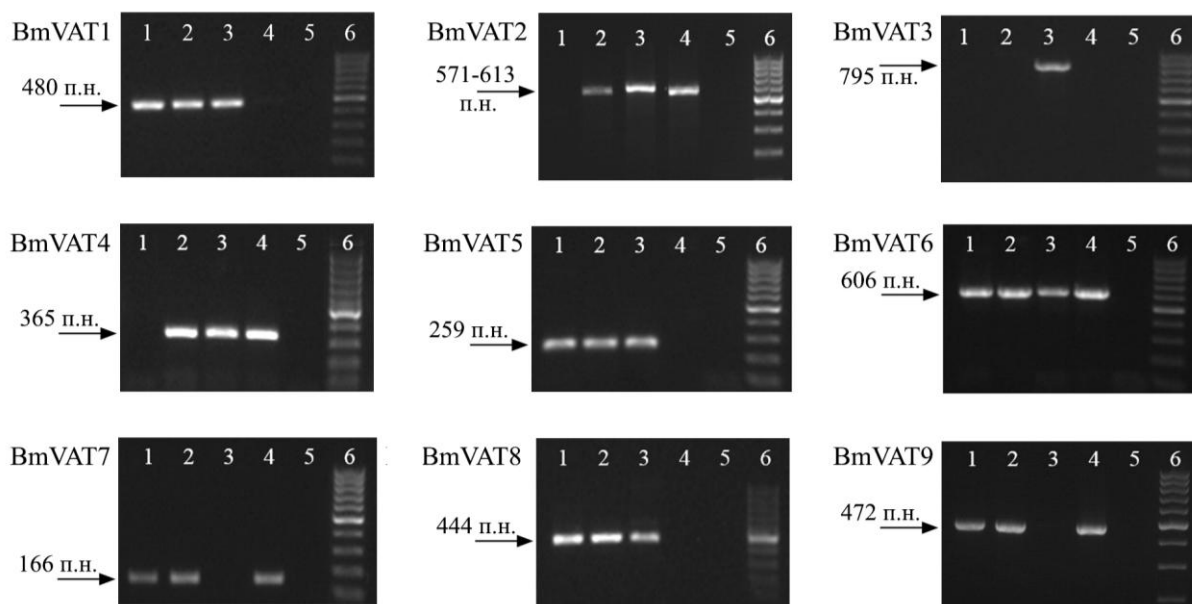
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка способа типирования штаммов возбудителя сапа на основе амплификации дифференцирующих регионов (DFR)

На первом этапе работы для поиска варибельных участков генома возбудителя сапа, которые могут быть использованы в качестве DFR-фрагментов, сравнили последовательности аннотированных геномов четырех штаммов *B. mallei* (ATCC 23344, NCTC 10229, NCTC 10247, SAVP1), доступных на момент начала исследования в GenBank NCBI. Анализ *in silico* структурной блочной реорганизации хромосом возбудителя сапа позволил определить степень гомологии отдельных фрагментов генома у разных штаммов *B. mallei* и создать коллекцию варибельных нуклеотидных последовательностей. После проверки с помощью алгоритма BLASTn выбрали девять дифференцирующих регионов генома, то есть фрагментов ДНК, варибельно присутствующих только у части штаммов *B. mallei*, обозначенные как VmVAT1, VmVAT2, VmVAT3, VmVAT4, VmVAT5, VmVAT6, VmVAT7, VmVAT8, VmVAT9. Для амплификации выбранных DFR-фрагментов сконструировали олигонуклеотидные праймеры.

Для каждой пары праймеров оптимизировали условия ПЦР, определили необходимые концентрации компонентов реакционных смесей, а также программы амплификации, при которых на электрофореграммах регистрировали четкие полосы, соответствующие размерам специфичных ампликонов (рис. 1). С помощью выбранных праймеров выявлены различные комбинации дифференцирующих регионов генома у штаммов *B. mallei*, отличающихся по региону происхождения. Показана перспективность применения DFR-анализа для изучения геномного полиморфизма штаммов возбудителя сапа.

Далее для исключения этапа электрофореза и сокращения времени получения результата разработали вариант амплификации DFR-локусов с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Сконструированы олигонуклеотидные гибридационные зонды по типу «молекулярного маяка», комплементарные выбранным дифференцирующим фрагментам ДНК.



1 – *B. mallei* 8, 2 – *B. mallei* B-120, 3 – *B. mallei* Bogor-37, 4 – *B. mallei* Z-12, 5 – отрицательный контроль, 6 – маркер молекулярных весов ДНК 100-1000 п.н.

Рисунок 1 – Электрофореграммы результатов амплификации DFR-локусов штаммов возбудителя сапа

В ходе дальнейших исследований подобраны концентрации компонентов реакционных смесей, позволяющие проводить специфичную амплификацию и детекцию всех анализируемых DFR-фрагментов в едином температурном режиме. Для удобства постановки DFR-типирования возбудителя сапа амплификацию дифференцирующих регионов генома решено проводить в 8-луночном стрипе. В ходе экспериментов установлена возможность мультиплексной амплификации двух пар локусов BmVAT1 с BmVAT5 и BmVAT6 с BmVAT7. Для подтверждения наличия ДНК *B. mallei* в исследуемом образце и контроля всех этапов проведения анализа в состав стрипа включена реакционная смесь для амплификации фрагмента гена *fliP*, видоспецифичного для возбудителя сапа, обозначенная Bm-Flip (рис. 2).

На основе разработанного методического подхода сконструированы экспериментальные наборы реагентов «Амплиген *Burkholderia mallei* DFR-тип-ЭФ» и «Амплиген *Burkholderia mallei* DFR-тип-РВ», предназначенные для генотипирования штаммов возбудителя сапа методом амплификации дифференцирующих регионов генома с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. Проведены контрольные лабораторные испытания. На оригинальные праймеры и зонды, входящие в состав наборов реагентов, получены патенты на изобретение.

Эффективность внутривидового типирования возбудителя сапа на основе амплификации дифференцирующих регионов генома была проверена с использованием разработанных наборов реагентов на 14 коллекционных штаммах *B. mallei*. По результатам амплификации девяти локусов составляли бинарные генетические профили, при этом наличие DFR-локуса обозначали как «1», отсутствие

– как «0». По сочетанию положительных и отрицательных результатов амплификации переменных фрагментов определяли DFR-типы исследуемых штаммов *B. mallei*.

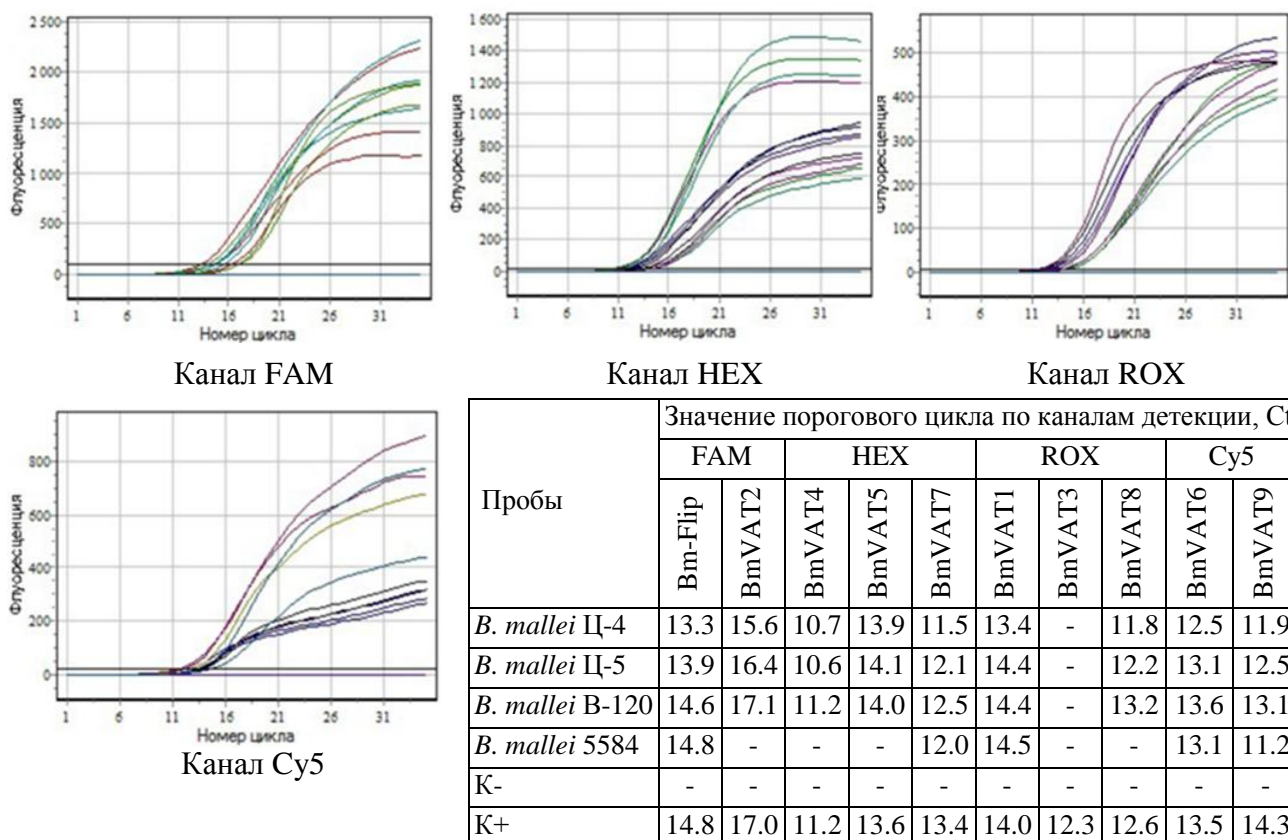
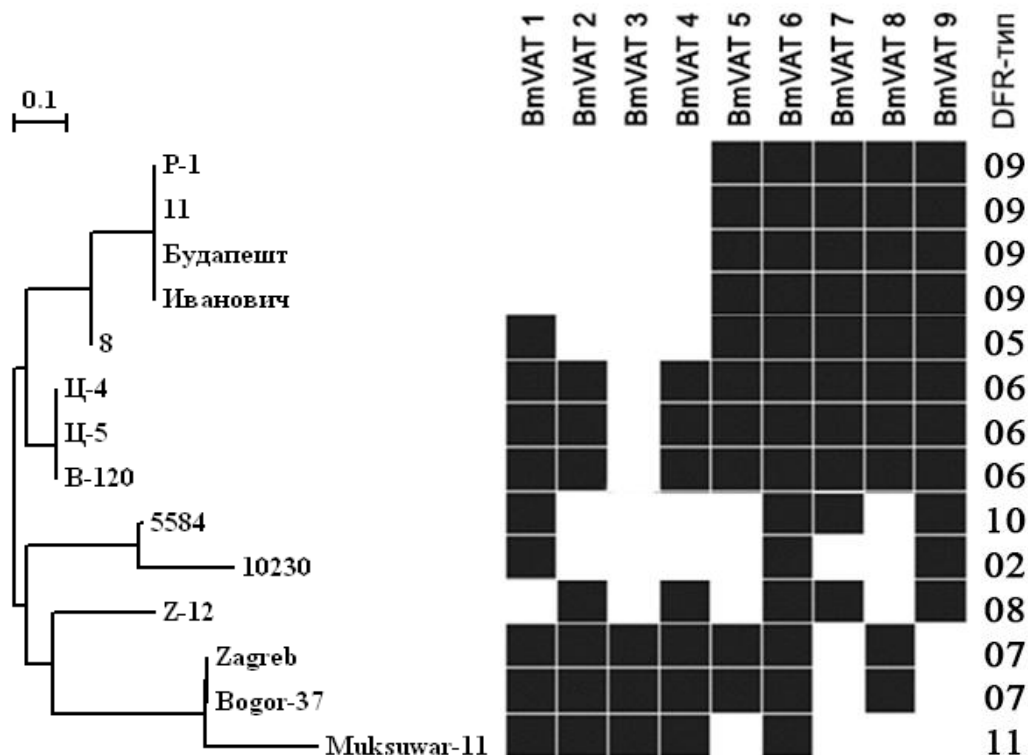


Рисунок 2 – Кривые накопления флуоресценции и значения порогового цикла при DFR-типировании штаммов *B. mallei* методом ПЦР в реальном времени

Установлено, что разработанный способ дифференциации штаммов возбудителя сапа позволил разделить 14 коллекционных штаммов *B. mallei* на 8 DFR-типов. При этом была отмечена связь определенных DFR-типов с регионами происхождения штаммов возбудителя сапа (рис. 3). Тип DFR09 объединил штаммы из Восточной Европы: *B. mallei* 11 из Польши, *B. mallei* Будапешт из Венгрии, штаммы *B. mallei* Иванович и *B. mallei* Р-1 из Югославии. Штамм *B. mallei* 8, выделенный в Польше, принадлежал к типу DFR05 и был расположен на одной ветви дендрограммы с Восточно-Европейскими штаммами (тип DFR09). Штамм *B. mallei* 10230 с типом DFR02, сведения об источнике выделения которого не сохранились, наиболее близок к штамму *B. mallei* 5584 из России, принадлежащему к типу DFR10.

Результаты кластерного анализа свидетельствовали о генетическом сходстве штаммов *B. mallei* Bogor-37 из Индонезии, *B. mallei* Zagreb из Югославии (тип DFR07) и штамма *B. mallei* Muksuwar-11 из Индии (тип DFR11). Согласно паспортным данным эти штаммы объединяет то, что изначально они входили в коллекцию ветеринарного института Роттердама. Штамм из Югославии *B. mallei* Z-12, расположенный на отдельной ветви дендрограммы, принадлежал к типу DFR08. К профилю DFR06 отнесены штаммы *B. mallei* Ц-4, *B. mallei* Ц-5 из Монголии и штамм *B. mallei* В-120, выделенный на границе с Монголией – в г. Улан-Удэ.

Учитывая общий DFR-тип данных штаммов, можно предположить, что вспышка сапа в Улан-Удэ в 1985 году произошла в результате завоза из Монголии больных сапом лошадей.



Закрашенные области соответствуют наличию специфического ампликона, белые – отсутствию ампликона.

Рисунок 3 – Neighbor-Joining дендрограмма и DFR-типы штаммов *B. mallei*

В целом прослеживалась определенная взаимосвязь между образовавшимися DFR-типами и регионами происхождения штаммов возбудителя сапа. Распределение штаммов *B. mallei* из Югославии по разным ветвям дендрограммы можно объяснить генетической гетерогенностью данных штаммов, неполной информацией о них или неточностью при проведении работы с культурами микроорганизмов.

Использование мультилокусного VNTR-анализа для генотипирования штаммов *B. mallei*

Поиск ДНК-мишеней для генотипирования штаммов возбудителя сапа методом мультилокусного анализа числа переменных tandemных повторов проводили путем анализа *in silico* 32 VNTR-локусов, предложенных U'Ren с соавторами [2007] для дифференциации близкородственного возбудителя мелиоидоза. Варибельность локусов оценивали с использованием полногеномных последовательностей четырех штаммов *B. mallei* из GenBank (ATCC 23344, NCTC 10229, NCTC 10247, SAVP1). Установлено, что большая часть локусов оказалась непригодна для дифференциации штаммов возбудителя сапа. Так, 16 фрагментов, содержащих tandemные повторы, полностью отсутствовали в исследуемых геномах *B. mallei*, а 4 VNTR-локуса присутствовали только у части штаммов. В качестве мишеней для генотипирования

отбирали локусы, присутствующие во всех проанализированных штаммах возбудителя сапа, у которых выявлено не менее трех аллельных вариантов. Выбрано 10 VNTR-локусов, соответствующих данным критериям: 933, 2065, 3145, 3652, 20, 1367, 1764, 1217, 2862, 2356.

Оценку эффективности применения выбранных VNTR-локусов для типирования возбудителя сапа провели на ДНК коллекционных штаммов *B. mallei*. При определении MLVA-профилей рассчитывали количество повторов в исследуемых локусах на основании размеров VNTR-фрагментов. Для установления размера ампликонов использовали электрофорез в полиакриламидном геле. С помощью секвенирования проводили верификацию количества повторов в анализируемых локусах.

В серии экспериментов на электрофореграмме у локуса 2065 выявлены двойные аллели, которые затрудняли анализ данных. Ампликоны локуса 2356 не обнаружены ни у одного из исследуемых штаммов. Локусы 1367 и 1764 были представлены в 1-2 аллельных вариантах. После анализа полученных результатов 6 переменных локусов (933, 3145, 3652, 20, 1217 и 2862), у которых обнаружено более 2 аллелей, были включены в схему MLVA-типирования *B. mallei*.

Для точного определения размера ампликонов применяли фрагментный анализ, с помощью которого проводили одновременную детекцию двух групп локусов: 933, 3145, 3652, а также 20, 1217 и 2862. С этой целью синтезировали прямые праймеры, меченые флуорофорами FAM, HEX и ROX. После отработки условий амплификации и проведения фрагментного анализа были достоверно определены размеры ампликонов анализируемых локусов у всех исследуемых штаммов *B. mallei*.

С использованием разработанного методического подхода для каждого штамма составлен индивидуальный MLVA-профиль, содержащий комбинацию повторов по шести локусам. Зарегистрирован большой разброс кратности повторов в определяемых VNTR-локусах – от 4 до 20. Степень изменчивости локусов находилась в диапазоне от 0,60 до 0,80. С помощью VNTR-анализа 14 коллекционных штаммов *B. mallei* разделили на 13 MLVA-типов, только один из которых представлен 2 штаммами, остальные генетические профили были уникальны (рис. 4).

Кластерный анализ результатов MLVA-типирования показал, что на дендрограмме штаммы возбудителя сапа Восточно-Европейского происхождения (*B. mallei* 8, *B. mallei* 11, *B. mallei* Будапешт, *B. mallei* P-1, *B. mallei* Иванович и *B. mallei* 5584) расположены на одной ветви, что согласовывалось с данными DFR-типирования. Одинаковый MLVA-тип характерен для штаммов *B. mallei* Ц-4 и *B. mallei* Ц-5, выделенных в Монголии. Штамм *B. mallei* B-120 расположен отдельно от штаммов из Монголии, однако анализ MLVA-профилей показал близость количества повторов в VNTR-локусах данных штаммов, что свидетельствовало об их родстве. Отдельный кластер сформирован штаммами *B. mallei* Muksuwar-11, *B. mallei* Bogor-37 из Индии и Индонезии, соответственно, и штаммом *B. mallei* Zagreb из Югославии, каждый штамм обладал уникальным MLVA-профилем. Как и в случае

типирования на основе амплификации дифференцирующих регионов генома, в дендрограмме, построенной по результатам мультилокусного анализа числа переменных тандемных повторов, образовавшиеся кластеры были связаны с регионом происхождения, за исключением некоторых штаммов.

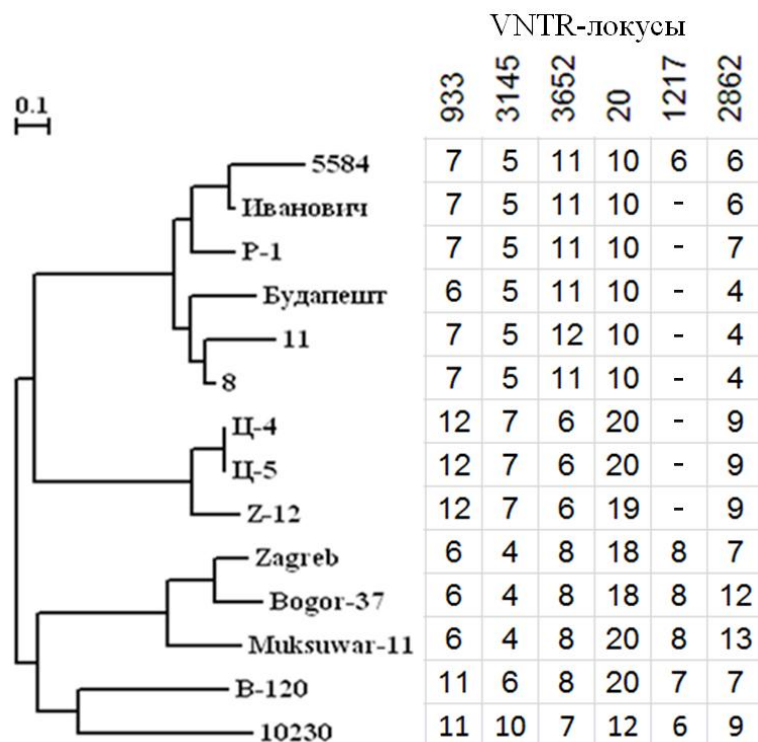


Рисунок 4 – Neighbor-Joining дендрограмма сходства штаммов возбудителя сапа, построенная по результатам MLVA-типирования и количеству повторов в VNTR-локусах штаммов *B. mallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

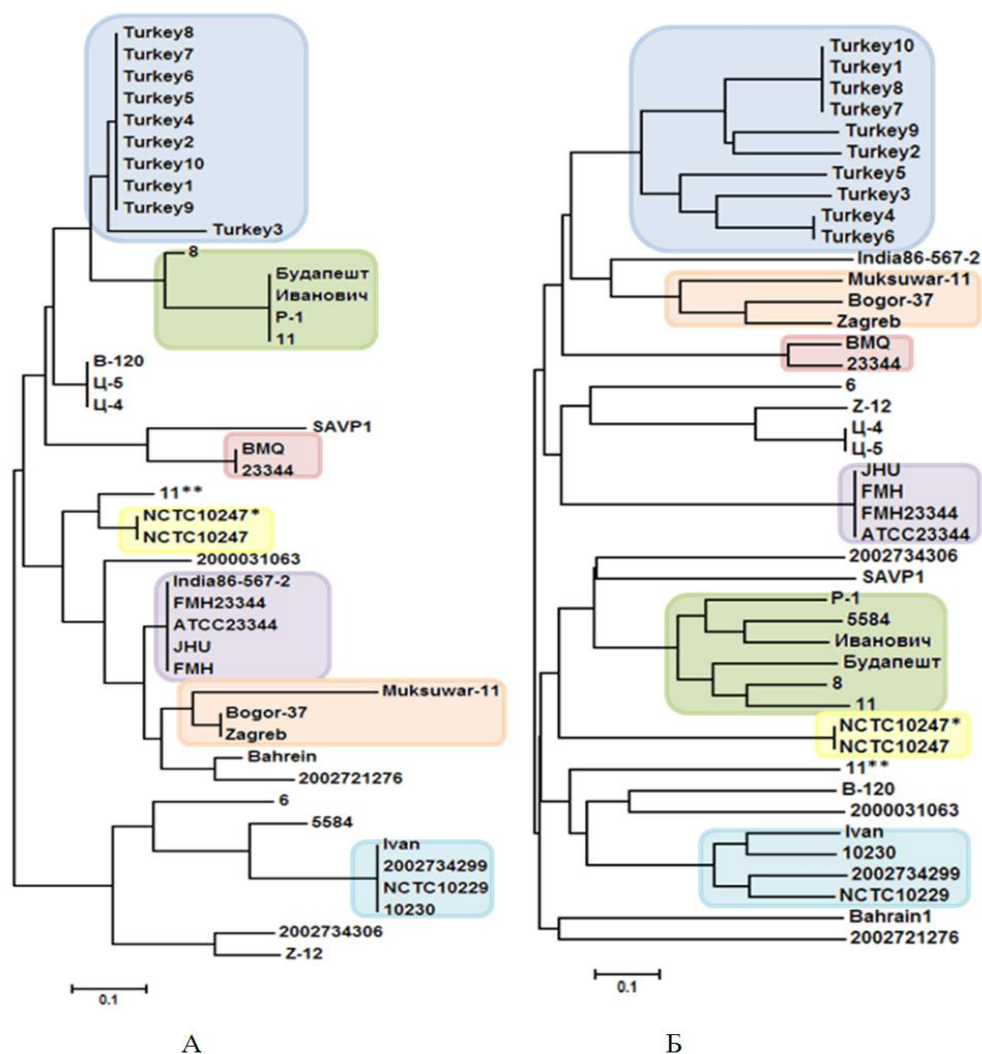
Учитывая высокую вариабельность VNTR-локусов, провели оценку их стабильности *in vivo* и *in vitro*. Сравнивали субпопуляции штаммов *B. mallei* B-120 и *B. mallei* Ц-4 до пассажа на белых мышах, а также полученные на 5-7 день и 20 день заражения. После проведения MLVA-типирования изменений количества повторов у пассированных *in vivo* штаммов возбудителя сапа не зарегистрировано. Для оценки стабильности *in vitro* сравнили генетические профили штаммов *B. mallei*, хранившихся в лиофилизированном состоянии, с MLVA-профилями аналогичных штаммов, поддерживаемых путем пересева сотрудниками института более 20 лет. Обнаружено 10 изменений в 4 VNTR-локусах у семи штаммов *B. mallei* после длительного культивирования. Наиболее вариабельными были локусы 3652 и 20. Все штаммы из данной коллекции имели уникальные MLVA-типы. Несмотря на изменение MLVA-профилей штаммов возбудителя сапа после длительного культивирования, уровень их кластеризации сохранялся. Полученные данные свидетельствовали о высокой вариабельности исследуемых VNTR-локусов и перспективности применения MLVA-типирования для клонального анализа штаммов возбудителя сапа.

Далее проанализировали опубликованные в работе Н.С. Scholz с соавторами [2014] генетические профили 75 штаммов возбудителя сапа из Пакистана, Бахрейна, Объединенных Арабских Эмиратов, коллекций Медицинского научно-исследовательского института инфекционных болезней армии США, института микробиологии Бундесвера. Для сопоставления результатов MLVA-типирования штаммов *B. mallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора использовали четыре VNTR-локуса: 933, 3145, 3652, 20, которые вошли и в 23-локусную схему, использованную в данной статье, и в предлагаемую нами 6-локусную MLVA-схему. Кластерный анализ показал определенную корреляцию между группированием штаммов и их регионом происхождения, особенно заметную для штаммов возбудителя сапа из Турции, Пакистана, ОАЭ и Бахрейна. Примечательно, что штаммы *B. mallei* из коллекции института микробиологии Бундесвера, выделенные на территории Индии, Индонезии и Югославии, имели такие же профили, что и штаммы *B. mallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора с аналогичными названиями и происхождением (*B. mallei* Muksuwar-11, *B. mallei* Bogor-37 и *B. mallei* Zagreb). Данный факт подтвердил высокую воспроизводимость и сопоставимость результатов MLVA-типирования, полученных в разных лабораториях.

Оценка эффективности разработанных способов генотипирования штаммов возбудителя сапа

Для оценки эффективности применения разработанных методических приемов определили *in silico* DFR-типы и MLVA-профили 29 штаммов *B. mallei*, полногеномные последовательности которых представлены в базе данных GenBank NCBI. При сопоставлении результатов типирования 43 штаммов возбудителя сапа, включая 14 коллекционных штаммов *B. mallei*, установлено, что с помощью разработанного способа DFR-типирования выявлено 20 DFR-типов, а при использовании метода MLVA – 35 типов. Для количественной оценки разрешающей способности методов применяли индекс дискриминации Хантера-Гастона, который для MLVA был равен 0,98, а для DFR составил 0,93, что свидетельствовало о высокой разрешающей способности разработанных молекулярно-генетических подходов.

Кластерный анализ дендрограмм по данным двух методов показал генетическую гетерогенность исследуемых штаммов, что объясняется разнообразием регионов их происхождения (рис. 5). Штаммы из Турции объединены в одну группу на каждой дендрограмме, также совпадает состав кластера штаммов из Венгрии. Сходным образом объединены сиквенсы штамма *B. mallei* NCTC10247, полученные в двух разных лабораториях. По данным обеих дендрограмм прослеживается связь штамма *B. mallei* ATCC 23344 и генетически родственных штаммов *B. mallei* FMH23344, *B. mallei* FMH и *B. mallei* JHU, выделенных после заражения от человека.



Цветом отмечены кластеры, совпадающие на обеих дендрограммах.

* последовательность штамма *B. mallei* NCTC 10247, определенная в Лос-Аламосской национальной лаборатории США; ** штамм *B. mallei* 11, выделенный в Турции, название которого совпадает с коллекционным штаммом *B. mallei* 11, выделенным в Польше.

Рисунок 5 – Дендрограммы, построенные по результатам DFR (А) и MLVA (Б) типирования штаммов возбудителя сапа

Большинство штаммов возбудителя сапа из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора распределились по группам, описанным выше (штаммы из Восточной Европы, штаммы из Монголии, штаммы из коллекции ветеринарного института Роттердама). Интересно отметить, что коллекционный штамм *B. mallei* 10230, полученный из Английской национальной коллекции типовых культур (NCTC) по результатам как DFR-, так и MLVA-типирования входил в кластер штаммов возбудителя сапа из Венгрии (*B. mallei* NCTC10229, *B. mallei* 2002734299, *B. mallei* Ivan). Учитывая, что по данным паспорта NCTC, он соответствует штамму *B. mallei* Ivan, можно предположить, что штамм *B. mallei* 10230 также выделен в Венгрии.

В целом сравнительный анализ дендрограмм выявил различный состав прикорневых узлов, но была отмечена согласованность в кластеризации штаммов с

общим источником происхождения, за исключением штамма *B. mallei* India86-567-2, который по результатам DFR-типирования вошел в одну кластерную группу с филогенетически отдаленными штаммами. Показано, что сочетанный анализ на основе двух разработанных молекулярно-генетических подходов позволяет снизить вероятность ошибок, вызванных гомоплазией генетических профилей.

Сравнение дендрограмм, полученных по результатам DFR-, MLVA-типирования, с дендрограммой полногеномных последовательностей штаммов возбудителя сапа, построенной с помощью встроенного алгоритма на сайте NCBI [URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tree/477>. Accessed on 11.04.18], показало сходный состав конечных кластеров, что подтвердило достоверность распределения исследуемых штаммов возбудителя сапа по данным кластерам.

Заключение, практические рекомендации и перспективы дальнейшего исследования

Таким образом, разработаны способы типирования возбудителя сапа на основе амплификации дифференцирующих регионов генома и мультилокусного анализа числа варибельных тандемных повторов в шести локусах, которые показали высокую дискриминирующую способность и воспроизводимость при внутривидовой дифференциации *B. mallei*. Кластеризация штаммов возбудителя сапа на основе MLVA согласовывалась с дифференциацией на основе DFR-типирования, а также с расположением штаммов на дендрограмме, построенной по результатам полногеномного анализа, и коррелировала с географическим регионом происхождения штаммов. Результаты DFR- и MLVA-типирования дополнили сведения о генетическом полиморфизме возбудителя сапа и внесены в паспорта коллекционных штаммов *B. mallei*. Комплексное применение данных методов обеспечит наиболее полное разделение исследуемых штаммов при сохранении достоверности результатов анализа.

Перспективным направлением дальнейшей работы является проведение DFR- и MLVA-типирования штаммов *B. mallei*, циркулирующих в приграничных с Россией странах и на эндемичных по сапу территориях. Пополнение электронных баз данных, содержащих DFR- и MLVA-профили штаммов *B. mallei*, повысит точность установления региона происхождения вновь выделенных штаммов возбудителя сапа. Разработанные методические подходы внутривидовой дифференциации *B. mallei* можно рекомендовать для осуществления эпидемиологического надзора за сапом на территории Российской Федерации, а также при выявлении случаев сапа для оперативного определения генетической характеристики штамма, установления источника инфекции, исследования путей заноса и распространения сапа.

Выводы

1. Определены варибельные локусы генома возбудителя сапа путем сравнительного анализа полногеномных последовательностей штаммов *B. mallei*. Выбраны 9 DFR-фрагментов: VmVAT1, VmVAT2, VmVAT3, VmVAT4, VmVAT5,

VmVAT6, VmVAT7, VmVAT8, VmVAT9, перспективные для внутривидовой дифференциации *B. mallei*.

2. Сконструированы праймеры и флуоресцентно-меченые зонды для амплификации подобранных дифференцирующих фрагментов генома *B. mallei*, на основе которых разработан способ DFR-типирования, обеспечивающий дифференциацию штаммов возбудителя сапа методом ПЦР с электрофоретическим и гибридационно-флуоресцентным учетом результатов.

3. С помощью разработанного методического подхода на основе амплификации дифференцирующих регионов генома при типировании 43 штаммов возбудителя сапа выявлено 20 DFR-типов, связанных с регионом происхождения большинства штаммов.

4. Выбраны VNTR-локусы 933, 3145, 3652, 20, 1217, 2862 с варьирующим числом повторов у штаммов *B. mallei*, на основе которых разработана схема MLVA-типирования, обладающая высокой дискриминирующей силой и позволившая разделить 43 исследуемых штамма возбудителя сапа на 35 генотипов.

5. Выявлено изменение MLVA-профилей штаммов возбудителя сапа после длительного культивирования, при этом отмечено сохранение уровня кластеризации изученных штаммов, что свидетельствует о перспективности использования разработанного подхода MLVA-типирования для клонального анализа штаммов *B. mallei*.

6. Показано, что кластеризация штаммов возбудителя сапа на основе результатов MLVA согласуется с результатами DFR-типирования и коррелирует с регионами происхождения штаммов *B. mallei*.

Список работ по теме диссертации

1. **Бондарева, О.С.** Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций / **О.С. Бондарева, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, А.И. Абуева, Ю.О. Муратова, В.А. Антонов** // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – № 1. – С. 34-44 (**журнал из Перечня ВАК**).

2. **Бондарева, О.С.** Генотипирование штаммов *Burkholderia mallei* на основе метода амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК / **О.С. Бондарева, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, Л.В. Лемасова, В.А. Антонов** // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. – Т. 34, № 1. – С. 33-37 (**журнал из Перечня ВАК, Scopus, WoS**).

3. Лемасова, Л.В. Разработка мультиплексной тест-системы для обнаружения и дифференциации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* методом ПЦР в режиме реального времени / Л.В. Лемасова, Г.А. Ткаченко, С.С. Савченко, **О.С. Бондарева, В.А. Антонов** // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 4. – С. 56-59 (**журнал из Перечня ВАК**).

4. Савченко, С.С. Генотипирование штаммов *B. mallei* с использованием

метода переменных ампликонов (VAT) / С.С. Савченко, В.А. Антонов, Г.А. Ткаченко, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, **О.С. Ульянова***, Л.В. Соколова, М.О. Нехезина // В сборнике: Современные технологии обеспечения биологической безопасности. Материалы III научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов: материалы конференции. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. – 2011. – С. 131-134.

5. **Бондарева, О.С.** Использование современных генетических методов для внутривидовой дифференциации возбудителя сапа / **О.С. Бондарева**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, В.А. Антонов // В сборнике: Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера. XI Межгосударственная научно-практическая конференция. – 2012. – С. 43-44.

6. **Бондарева, О.С.** Генотипирование штаммов *Burkholderia mallei* методом мультилокусного анализа числа переменных tandemных повторов / **О.С. Бондарева**, С.С. Савченко, И.М. Шпак, А.А. Батулин // В книге: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины. Материалы юбилейной 70-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. Под редакцией: В.И. Петрова; Редколлегия: М.Е. Стаценко, А.В. Смирнов, В.Л. Загребин. – 2012. – С. 304-305.

7. **Бондарева, О.С.** Разработка схемы типирования штаммов *Burkholderia mallei* на основе амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК с гибридно-флуоресцентной детекцией результатов / **О.С. Бондарева**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, В.А. Антонов // В сборнике: Молекулярная диагностика. Сборник трудов. Под редакцией В.И. Покровского. – 2014. – С. 483-484.

8. Савченко, С.С. Реаранжировка геномов патогенных буркхольдерий при существовании в различных экологических нишах / С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, **О.С. Бондарева**, М.Л. Леденева, И.М. Шпак, А.А. Батулин, А.И. Абуева, Ю.О. Муратова, Н.Г. Плеханова, Р.О. Абдрахманова, О.В. Дандина, В.А. Антонов // В сборнике: Молекулярная диагностика. Сборник трудов. Под редакцией В.И. Покровского. – 2014. – С. 484-485.

9. Молчанова, Е.В. Паспортизация коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий / Е.В. Молчанова, Я.А. Лопастейская, Т.Н. Шаров, **О.С. Бондарева**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, И.Б. Захарова, Н.П. Агеева // В книге: Современные проблемы эпидемиологии и гигиены. Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2015. – С. 158-160.

10. Ткаченко, Г.А. Совершенствование диагностики сапа и мелиоидоза на основе современных методов амплификации нуклеиновых кислот / Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, Л.В. Лемасова, **О.С. Бондарева**, С.С. Савченко, В.А. Антонов // В

сборнике: Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года. Материалы XIII Межгосударственной научно-практической конференции. Под редакцией А.Ю. Поповой, В.В. Кутырева. – 2016. – С. 233-235.

11. **Бондарева, О.С.** Выбор оптимального набора VNTR-локусов для MLVA-типирования штаммов *Burkholderia mallei* / **О.С. Бондарева**, М.Л. Леденева, Л.В. Лемасова, Г.А. Ткаченко // В книге: Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2017. – С. 24-26.

12. **Бондарева, О.С.** Сап – возвращающаяся инфекция, перспективы применения молекулярно-генетических технологий для эпидемиологического мониторинга / **О.С. Бондарева**, М.Л. Леденева, Л.В. Лемасова, А.А. Батулин, И.М. Шпак, Г.А. Ткаченко // В книге: Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы. Материалы X Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – 2018. – С. 34.

13. Патент 2474615 РФ, МПК С12Р19/30, С12Q1/68, С12N1/20, С12R1/01 Олигонуклеотидные праймеры для генотипирования *B.mallei* методом полимеразной цепной реакции / С.С. Савченко, В.А. Антонов, **О.С. Ульянова***, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, Г.А. Ткаченко, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2012102743/10; заявл. 26.01.2012; опубл. 10.02.2013, Бюл. №4.

14. Патент 2474616 РФ, МПК С12Р19/30, С12Q1/68, С12N1/20, С12R1/01 Олигонуклеотидные праймеры для генотипирования *B.mallei* методом полимеразной цепной реакции / С.С. Савченко, В.А. Антонов, **О.С. Ульянова***, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, Г.А. Ткаченко, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2012102745/10; заявл. 26.01.2012; опубл. 10.02.2013, Бюл. №4.

15. Патент 2474617 РФ, МПК С12Р19/30, С12Q1/68, С12N1/20, С12R1/01 Олигонуклеотидные праймеры для генотипирования *B.mallei* методом полимеразной цепной реакции / С.С. Савченко, В.А. Антонов, **О.С. Ульянова***, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, Г.А. Ткаченко, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2012102751/10; заявл. 26.01.2012; опубл. 10.02.2013, Бюл. №4.

16. Патент 2474618 РФ, МПК С12Р19/30, С12Q1/68, С12N1/20, С12R1/01 Олигонуклеотидные праймеры для генотипирования *B.mallei* методом полимеразной цепной реакции / С.С. Савченко, В.А. Антонов, **О.С. Ульянова***, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, Г.А. Ткаченко, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2012102752/10; заявл. 26.01.2012; опубл. 10.02.2013, Бюл. №4.

17. Патент 2474619 РФ, МПК С12Р19/30, С12Q1/68, С12N1/20, С12R1/01

Олигонуклеотидные праймеры для генотипирования *B.mallei* методом полимеразной цепной реакции / С.С. Савченко, В.А. Антонов, **О.С. Ульянова***, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, Г.А. Ткаченко, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2012102756/10; заявл. 26.01.2012; опубл. 10.02.2013, Бюл. №4.

18. Патент 2474620 РФ, МПК С12Р19/34, С12Q1/68 Олигонуклеотидные праймеры VmVAT5-Ch2s/ VmVAT5-Ch2as для обнаружения фрагмента дифференциации ВМАО107 штаммов возбудителя сапа / С.С. Савченко, В.А. Антонов, **О.С. Ульянова***, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, Г.А. Ткаченко, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2012102749/10; заявл. 26.01.2012; опубл. 10.02.2013, Бюл. №4.

19. Патент 2478713 РФ, МПК С12Р19/30, С12Q1/68 Олигонуклеотидные праймеры для генотипирования *B.mallei* методом полимеразной цепной реакции / С.С. Савченко, В.А. Антонов, **О.С. Ульянова***, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, Г.А. Ткаченко, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2012102757/10; заявл. 26.01.2012; опубл. 10.04.2013, Бюл. №10.

20. Патент 2478714 РФ, МПК С12Р19/30, С12Q1/68, С12N1/20, С12R1/01 Олигонуклеотидные праймеры VmVAT7-Ch2s/ VmVAT7-Ch2as для обнаружения фрагмента дифференциации ВМАО871 штаммов возбудителя сапа / С.С. Савченко, В.А. Антонов, **О.С. Ульянова***, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, Г.А. Ткаченко, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2012102747/10; заявл. 26.01.2012; опубл. 10.04.2013, Бюл. №10.

21. Патент 2478715 РФ, МПК С12Р19/30, С12Q1/68, С12N1/20, С12R1/01 Олигонуклеотидные праймеры для генотипирования *B.mallei* методом полимеразной цепной реакции / С.С. Савченко, В.А. Антонов, **О.С. Ульянова***, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, Г.А. Ткаченко, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2012102754/10; заявл. 26.01.2012; опубл. 10.04.2013, Бюл. №10.

22. Патент 2551227 РФ, МПК С12Q1/04, С12Q1/68, С12Р19/30 Набор флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов для типирования штаммов *Burkholderia mallei* методом амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК / **О.С. Бондарева**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, В.А. Антонов, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2012102754/10; заявл. 04.03.2014; опубл. 20.05.2015, Бюл. № 14.

«*» – фамилия Ульянова изменена на Бондарева

Список сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ПЦР – полимеразная цепная реакция; BLAST – алгоритм базового локального выравнивания; DFR – дифференцирующий регион генома; MLVA – мультилокусный анализ числа переменных тандемных повторов; NCBI – национальный центр биотехнологической информации США; NCTC – национальная коллекция типовых культур, Великобритания; VNTR – варьирующие по числу тандемные повторы.

Благодарности

Выражаю глубокую признательность и благодарность научному руководителю работы к.м.н., доценту Ткаченко Г.А. за профессиональные советы и поддержку в процессе работы. Благодарю директора ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора Топоркова А.В. за предоставленную возможность выполнения работы. Выражаю искреннюю благодарность сотрудникам ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора д.б.н. Викторову Д.В., д.м.н., профессору Мериновой Л.К., к.м.н. Новицкой И.В., к.м.н. Плехановой Н.Г., к.м.н. Агеевой Н.П., к.б.н. Будченко А.А., к.м.н. Савченко С.С., Шпаку И.М., Леденевой М.Л., Лемасовой Л.В. за помощь на различных этапах работы и обсуждение результатов исследования.