

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2017 • том 2 • №3

В НОМЕРЕ

Материалы III Национального конгресса бактериологов
В рамках XI съезда Всероссийского научно-практического общества
эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНОЭМП)
г. Москва, 16–17 ноября 2017 г.

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

Главный редактор

И.А.Дятлов, академик РАН, д.м.н., профессор
(Россия)

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

А.П.Анисимов, д.м.н., проф. (Россия)
С.В.Балахонов, д.м.н., проф. (Россия)
А.Н.Куличенко, член-корр. РАН, д.м.н., проф. (Россия)
В.В.Кутырев, академик РАН, д.м.н., проф. (Россия)
Н.В.Рудаков, д.м.н., проф. (Россия)
Сун Чжичжоу (Китай)

Редколлегия

Адъяасүрэн Зэвиймядагийн, к.м.н. (Монголия)	И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Узбекистан)
И.А.Базиков, д.м.н., проф. (Россия)	Т.В.Мека-Меченко, д.м.н. (Казахстан)
В.А.Горбунов, к.м.н. (Белоруссия)	В.Л.Мотин, проф. (США)
В.А.Давидянц, д.б.н., проф. (Армения)	А.Ракин (Германия)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)	Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
Л.В.Домотенко, к.х.н. (Россия)	В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
Г.А.Каримова, к.б.н. (Франция)	Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
А.В.Карлышев, к.х.н., проф. (Англия)	К.Ю.Шаталин, к.б.н. (США)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)	И.Г.Шемякин, д.б.н., проф. (Россия)
М.Косой, к.б.н. (США)	А.П.Шепелин, д.б.н. (Россия)
Ш.Х.О.Курбанов, к.м.н. (Азербайджан)	

Учредитель

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

Адрес учредителя и редакции:

142279, Московская область,
Серпуховский район, п. Оболенск
ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: +7-4967-360003
+7-4967-360046
Факс: +7-4967-360010
E-mail: bacteriology@obolensk.org
info@obolensk.org

Издатель

© «Издательство «Династия»



www.phdynasty.ru

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий
и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Регистрационный номер
ПИ №ФС 77-66792 от 15.08.2016 г.

Журнал «Бактериология»
является рецензируемым изданием.
Выходит четыре раза в год.
Основан в 2016 году.
Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных материалов.
Тираж 1000 экз. Цена свободная.
Отдел рекламы:
Телефон: +7 495 517-7055

Передовая статья

К 95-летию Госсанэпидслужбы России

И.А.Дятлов, И.Г.Говорунов **5**

Диагностическая значимость рекомбинантного белка GroEL FTT_1696

для выявления противотуляреминых антител

А.А.Горбатов, Е.А.Панферцев, Е.В.Баранова, П.В.Соловьев, Т.И.Комбарова,

Г.М.Титарева, Т.Б.Кравченко, А.Н.Мокриевич, С.Ф.Бикетов **9**

Особенности микробиоты дыхательных путей при заболеваниях респираторного тракта

Е.В.Наумкина, Е.В.Матущенко, И.И.Калитина, О.А.Абросимова, Т.В.Пядочкина, А.И.Матущенко **16**

Фунгицидная активность опытных образцов ниосомальных антигрибковых гелей

И.А.Базиков, А.Н.Мальцев, А.Е.Щекотихин, А.Н.Тевяшова, В.В.Бинатова, М.А.Селимов **21**

Анализ белковых препаратов вирулентных штаммов *Y. pestis* методом двумерного электрофореза

П.Х.Копылов, Е.А.Красильникова, О.Н.Перовская, Р.З.Шайхутдинова,

С.А.Иванов, Е.А.Тюрин, А.П.Анисимов, С.В.Дентовская **28**

Современное состояние проблемы сибирской язвы

Н.А.Шишкова, Е.А.Тюрин, Л.И.Маринин, И.А.Дятлов, А.Н.Мокриевич **33**

Тезисы докладов III Национального конгресса бактериологов

В рамках XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов,

микробиологов и паразитологов (ВНОЭМП). Москва, 16–17 ноября 2017 г. **41**

Правила для авторов **126**

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

I.A.Dyatlov, academician of RAS
(Russia)

Executive Secretary

I.G.Govorunov, Sc.D.
(Russia)

Editorial Council

A.P.Anisimov, Sc.D., prof. (Russia)
S.V.Balakhonov, Sc.D., prof. (Russia)
A.N.Kulichenko, corr. member of RAS, Sc.D., prof. (Russia)
V.V.Kutyrev, academician of RAS, Sc.D., prof. (Russia)
N.V.Rudakov, Sc.D., prof. (Russia)
Sun Chzhichzhou (China)

Editorial Board

Ad"yaasyren Zeviimyadagiin, PhD (Mongolia)
I.A.Bazikov, Sc.D., prof. (Russia)
L.N.Chernousova, Sc.D., prof. (Russia)
V.A.Davidyants, Sc.D., prof. (Armenia)
S.V.Dentovskaya, Sc.D. (Russia)
L.V.Domotenko, PhD (Russia)
V.A.Gorbunov, PhD (Belarus)
G.A.Karimova, PhD (France)
A.V.Karlyshev, PhD, prof. (England)
L.V.Kolombet, Sc.D. (Russia)
M.Kosoi, PhD (USA)

Sh.Kh.O.Kurbanov, PhD (Azerbaijan)
I.Kh.Mamatkulov, Sc.D., prof. (Uzbekistan)
T.V.Meka-Mechenko, Sc.D. (Kazakhstan)
V.L.Motin, prof. (USA)
A.Rakin (Germany)
K.Yu.Shatalin, PhD (USA)
I.G.Shemyakin, Sc.D., prof. (Russia)
A.P.Shepelin, Sc.D. (Russia)
E.A.Svetoch, Sc.D., prof. (Russia)
V.N.Tsarev, Sc.D., prof. (Russia)

Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Editorial Office:

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Obolensk, Moscow region, 142279
Phone: +7-4967-360003, +7-4967-360046
Fax: +7-4967-360010
E-mail: bacteriology@obolensk.org
info@obolensk.org

Publisher

© «Dynasty» Publishing House



www.phdynasty.ru

Advertising Department:

Phone: +7 495 517 7055; e-mail: reklama@mm-agency.ru

Editorial

95th anniversary of the State Sanitary and Epidemiological Service of Russia

I.A.Dyatlov, I.G.Govorunov **5**

Diagnostic significance of the recombinant protein GroEL FTT_1696 for the identification of antituberculous antibodies

*A.A.Gorbatov, E.A.Panfertsev, E.V.Baranova, P.V.Solov'ev, T.I.Kombarova,
G.M.Titareva, T.B.Kravchenko, A.N.Mokrievid, S.F.Biketov* **9**

Peculiarities of microbiotes of respiratory ways under respiratory tract diseases

E.V.Naumkina, E.V.Matushchenko, I.I.Kalitina, O.A.Abrosimova, T.B.Piadochkin, A.I.Matushchenko **16**

Fungicidal activity of experimental species of niosomal antifungal gels

I.A.Bazikov, A.N.Maltsev, A.E.Schekotikhin, A.N.Tevyashova, V.V.Binatova, M.A.Selimov **21**

Analysis of *Y. pestis* virulent strain proteins by two-dimensional electrophoresis

*P.Kh.Kopylov, Ye.A.Krasil'nikova, O.N.Perovskaya, R.Z.Shaykhutdinova,
S.A.Ivanov, Ye.A.Tyurin, A.P.Anisimov, S.V.Dentovskaya* **28**

Modern state of the anthrax problem

N.A.Shishkova, E.A.Tyurin, L.I.Marinin, I.A.Dyatlov, A.N.Mokrievid **33**

Abstracts of the III National Congress of Bacteriologists

Within the framework of the 11th Congress of the All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists,

Microbiologists and Parasitologists. Moscow, 16–17 November 2017 **41**

Instructions for Authors **126**

К 95-летию Госсанэпидслужбы России

Днем основания санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации считается 15 сентября 1922 года, поскольку именно эта дата стоит на декрете Совнаркома РСФСР «О санитарных органах Республики». Этот документ определил задачи, структуру и функциональные обязанности вновь созданной службы, заложил основы создания специализированных санитарно-профилактических учреждений.

С образованием нового государства не менялась структура заболеваний на территории бывшей Российской империи, методы их лечения и профилактики, однако в значительной мере изменениям подлежала социальная направленность медицины, ее государственная структура и, в частности, организация и задачи санитарно-эпидемиологического надзора.

Эти проблемы обсуждались учеными-медиками и практикующими врачами в рамках серии всероссийских медицинских съездов, проходивших в эти годы. В частности, VI Всероссийский съезд бактериологов и эпидемиологов (1922 год) был посвящен вопросам организации санитарного дела. В этот период были заложены нормативно-правовые основы обеспечения и контроля за средой обитания человека, включая сферу производства. Создавалась сеть медицинских учреждений по борьбе с профессиональной заболеваемостью, образовывались научно-исследовательские учреждения в области гигиены и эпидемиологии. Значительные меры предпринимались в области подготовки специалистов социально-гигиенического профиля, санитарных врачей, эпидемиологов и бактериологов.

В 30-е годы, вероятно, впервые в медицинской практике работа в области здравоохранения начала проводиться на основе планирования (I Всесоюзная конференция по планированию здравоохранения и рабочего отдыха, 1932 г.). Одним из результатов работы этой конференции стала повсеместная организация санитарно-эпидемиологических станций. В связи с ускоренным промышленным развитием страны, развитием городов, существенно расширился санитарный надзор на предприятиях и в жилищно-коммунальном хозяйстве.

К 1940 г. в стране действовала сеть санитарно-эпидемиологических учреждений в составе около 2000 санэпидстанций, 787 дезинфекционных и 1929 малярийных станций, пунктов и отрядов, 47 бруцеллезных станций и 49 противочумных учреждений. В 1935 г. была создана Всесоюзная Государственная санитарная инспекция, а в 1936 г. начала формироваться санитарно-эпидемиологическая служба страны.

Несмотря на разруху после гражданской войны, экономические проблемы, стоявшие перед новым государством, усилиями медиков к середине 30-х годов на территории СССР была ликвидирована натуральная оспа, вдвое снизилась заболеваемость брюшным тифом, почти исчез сыпной тиф.

Результаты научных исследований в области гигиены, эпидемиологии и микробиологии ознаменовались открытием вируса клещевого энцефалита (Л.А.Зильбер), пионерскими работами по природной очаговости болезней (Е.Н.Павловский, Г.А.Петрищева, Н.Г.Олсуфьев). Под руководством Ученого медицинского совета Наркомздрава РСФСР устанавливались тесные связи санитарной практики с разработками научных учреждений в области гигиены и эпидемиологии. Были разработаны и запущены в производство противодифтерийная сыворотка (П.Ф.Здродовский), столбнячный анатоксин (Воскресенский), живая сибиреязвенная вакцина СТИ (Н.Н.Гинзбург), бруцеллезный диагностикум (П.Ф.Здродовский). На смену работ в условиях чрезвычайных ситуаций пришла планомерная профилактика инфекционных и неинфекционных заболеваний посредством улучшения условий труда и быта населения.

Организационные основы и формирование кадрового состава санитарно-эпидемиологической службы, созданные в предвоенные годы, испытали, что называется, «проверку боем» в период Великой Отечественной войны 1941–1945 гг. Непосредственно военные действия, миграционные потоки населения, многообразные лишения и беды существенно обострили эпидемическую обстановку в стране. Начали распространяться острые кишечные заболевания и дизентерия, тифо-паратифозные заболевания, в частности сыпной тиф, малярия, вирусный гепатит и другие инфекции. Наркомздрав СССР разработал и осуществлял комплекс противоэпидемических мероприятий в армии, на транспорте, среди гражданского населения. В годы Великой Отечественной войны в армии сформировалась система специализированных противоэпидемических подразделений, включающая санитарно-эпидемиологические отряды, инфекционные госпитали, обмывочно-дезинфекционные роты, санитарные взводы, санитарно-контрольные пункты, санитарно-эпидемиологические лаборатории, инфекционные полевые подвижные госпитали и пр. В военный период были разработаны и применялись формоловая и химическая ассоциированная вакцины против кишечных инфекций, живая противотуляремийная вакцина, вакцины против сыпного тифа, сибирской язвы, чумы.

С 1941 по 1943 гг. число санитарно-эпидемиологических станций увеличивается более чем на треть. Существенно возрастает роль общественных санитарных инспекторов и активистов Общества Красного Креста и Красного Полумесяца. Повсюду строятся бани и дезинфекционные камеры. Создается система надежных противоэпидемических барьеров на железных дорогах. В ходе выполнения противоэпидемических мероприятий в действующей армии создаются специальные формирования по надзору и выполнению санитарно-гигиенических норм, включая качественное калорийное питание, безопасное водоснабжение, поддержание военнослужащими личной гигиены. Благодаря принятым

мерам доля инфекционных болезней в общей заболеваемости была менее 10%.

По завершении войны и ликвидации в целом ее негативных последствий наступил новый этап отечественного здравоохранения. В 60-е годы существенно расширяется материально-техническая база учреждений, осуществляются мероприятия по ликвидации ряда инфекционных заболеваний, и болезней местного распространения, ведется борьба с брюшным тифом, коклюшем, аскаридозом, острыми кишечными инфекциями и бруцеллезом. Решениями руководства страны научно-исследовательские учреждения медико-биологического профиля нацеливаются на разработку методов и средств для лечения и профилактики гриппа, ангины, кори, эпидемического гепатита, кишечных инфекций. Получают развитие новые направления – радиационная гигиена, гигиена и токсикология пестицидов.

Важными событиями этих лет стали XIV Всесоюзный съезд гигиенистов и санитарных врачей (1962 г.) и Постановление Совета министров СССР «О Государственном санитарном надзоре в СССР», утвердившее новое «Положение о Государственном санитарном надзоре в СССР» (1963 г.). Реорганизация санитарно-эпидемиологической службы была продолжена в соответствии с Постановлением Совета министров СССР «О Государственном санитарном надзоре в СССР» (1973 г.), которое определяло основным учреждением системы санитарно-эпидемиологической службы санитарно-эпидемиологическую станцию на всех административно-хозяйственных уровнях. Этим постановлением учреждена должность Главного государственного санитарного врача. Благодаря этим и другим мерам в стране начала снижаться заболеваемость инфекционными болезнями, существенно снижается тяжесть их протекания.

Новые времена ставили новые проблемы. Внимание широкой общественности обратилось на вопросы экологии, охраны окружающей среды. Впервые в мире в нашей стране были установлены научно обоснованные предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в атмосферном воздухе различных производств, в воде водоемов, в продуктах питания. В середине 80-х годов в стране действовало около 2000 величин ПДК для воздуха рабочей зоны, химических загрязнителей атмосферного воздуха, воды водоемов и почвы.

В 1971 г. Верховные Советы СССР и республик приняли законы о здравоохранении, в которых охрана здоровья людей ставилась в приоритеты государства, специальные разделы были посвящены обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения. В этих законах было определено, что санитарно-эпидемиологическое благополучие населения обеспечивается проведением комплексных санитарно-гигиенических и санитарно-противоэпидемических мероприятий и системой государственного санитарного надзора.

Во второй половине XX столетия достижения гигиенической и эпидемиологической науки, практическая работа государственной санитарной службы способствовали снижению инфекционной заболеваемости по ряду нозологических форм. Были разработаны и внедрены в практику вакцины против дифтерии, кори, эпидемического паротита, полиомиелита, гриппа, была создана эффективная система вакцинопрофилактики.

В 50–60-е годы в мире разворачивается кампания по ликвидации оспы, в которой весомое участие приняли отечественные ученые-эпидемиологи О.Г.Анджапаридзе, В.М.Жданов, С.С.Маренникова, И.Д.Ладный, О.В.Бароян и другие. СССР предоставил Всемирной организации здравоохранения большие партии противооспенной вакцины. В Индию, Ирак, Иран, Афганистан, Бирму и другие страны, где проводились противооспенные мероприятия, выезжали для консультаций наши специалисты-медики. В 1980 г. ВОЗ сообщила о ликвидации оспы на земном шаре.

Приказом Минздрава СССР «О календаре профилактических прививок и основных положениях об их организации и проведении» (1980 г.) в стране вводится новый календарь прививок, согласно которому иммунизацией охватывается больше детей в оптимальные возрастные интервалы.

Развитие санитарно-эпидемиологической службы продолжилось и, в 1970-е годы. К середине 70-х годов число санэпидстанции и врачей санитарно-противоэпидемического профиля увеличилось почти в 4 раза по сравнению с 1940 г. Доля средств госбюджета на нужды охраны здоровья в это период составляла 6%.

К концу 60-х годов назрел вопрос изменения концепции санитарной охраны государственных границ. Мероприятия по предотвращению заноса и распространения карантинных болезней в новых условиях с государственных кордонов сместились на территорию всей страны. В тесном сотрудничестве с ВОЗ разрабатывается концепция международного эпидемиологического надзора.

В связи с распадом СССР и образованием самостоятельного государства «Российская Федерация» в новых условиях разворачивается новый этап законотворчества и организационных преобразований органов здравоохранения. В августе 1996 г. Указом Президента Российской Федерации Госсанэпиднадзор присоединяется к Министерству здравоохранения Российской Федерации в составе Департамента государственного санитарно-эпидемиологического надзора. В 1999 г. принимается новый вариант закона «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения». Указом Президента Российской Федерации от 9 марта 2004 г. №314 «О системе и структуре федеральных органов исполнительной власти» была образована Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), которой, кроме санэпиднадзора, был передан ряд функций от Минздрава, Минэкономразвития и Министерства по антимонопольной политике Российской Федерации. В 2012 г. Роспотребнадзор был напрямую переподчинен Правительству Российской Федерации. В настоящее время Федеральная служба является уполномоченным федеральным органом исполнительной власти, осуществляющим функции по контролю и надзору в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации, защиты прав потребителей на потребительском рынке.

С 1991 г. Роспотребнадзор достиг определенных успехов в обеспечении санитарного благополучия страны. Внедрены рискориентированный подход в сфере контрольно-надзорной деятельности, система оценки результативности и эффективности. Пересмотрены методические подходы

к планированию контрольно-надзорных мероприятий, определены приоритеты и сконцентрированы усилия на проверке объектов предпринимательской деятельности с высоким потенциальным риском причинения вреда жизни и здоровью человека. Научные организации Роспотребнадзора начали работу на основе пятилетних отраслевых научно-исследовательских программ. За последние годы утверждены и зарегистрированы Минюстом России десятки санитарных правил, гигиенических нормативов и прочих методических и нормативных документов. На международном уровне, кроме традиционной совместной деятельности со Всемирной организацией здравоохранения, начата и успешно осуществляется работа с новыми партнерами: Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций, Международным агентством по атомной энергии, государствами-участниками ЕАЭС, СНГ, ШОС и БРИКС. В рамках программ помощи силами Роспотребнадзора осуществляется подготовка и обучение зарубежных специалистов в области лабораторной диагностики, эпидемиологии, организации противоэпидемических мероприятий и обеспечения биологической безопасности. Партнерам передается современное оборудование и технологии для проведения эпидразведки и мониторинга природных очагов инфекционных болезней. Это развивающееся международное сотрудничество Роспотребнадзора усиливает лидерство Российской Федерации в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Евразии, влияние на формирование глобальной повестки дня в области борьбы с инфекционными болезнями, обеспечения безопасной среды обитания человека, безопасного, полноценного и качественного питания и других актуальных вопросов санитарно-эпидемиологического благополучия.

Даже этот краткий обзор основных этапов становления санитарно-эпидемиологической службы России позволяет выделить особую роль исследований и разработок, выполняемых учеными и специалистами научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора. С одной стороны, эти работы расширяют наши фундаментальные знания о возбудителях инфекционных заболеваний, закономерностях эпидемических процессов, особенностях их взаимодействия с организмом человека. С другой – они являются прочной базой для создания новых методов профилактики и лечения инфекционных заболеваний, основой для выработки комплексных решений по мониторингу, предотвращению и ликвидации чрезвычайных ситуаций в области биологической безопасности.

Ярким примером соединения науки и практики является деятельность Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (Московская область, п. Оболенск). Созданный более 40 лет назад в соответствии с Постановлением ЦК КПСС и Совета министров СССР «О мерах по ускоренному развитию молекулярной биологии и молекулярной генетики и использованию их достижений в народном хозяйстве» 1974 г., центр длительное время разрабатывал методы получения новых форм микроорганизмов, проводил их лабораторную и производственную оценку, создавал и совершенствовал технологии получения биопрепаратов на основе бактерий и грибов, конструировал

новые приборы для научных исследований и контроля технологических процессов по заданиям Главмикробиопрома, РАО «Биопрепарат», Министерства обороны.

Распоряжением Правительства Российской Федерации с 2006 г. ГНЦ ПМ был передан Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Ученые Центра были переориентированы на проведение фундаментальных и прикладных научных исследований и работ в области эпидемиологии, бактериологии и биотехнологии, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения, включая опытно-промышленное производство биотехнологической продукции. Благодаря квалификации своих сотрудников, уникальному оснащению Центр становится одной из ключевых научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора. На него возлагались координирующие функции по федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы и 2015–2020 годы)». Реализация данной программы позволила не только существенно развить научные исследования в области биологической безопасности, оснастить лаборатории современным оборудованием, но и провести масштабные реконструкции инфраструктуры научных подразделений Службы.

На базе института работают Центр индикации и диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней Роспотребнадзора для субъектов Центрального федерального округа и референс-центры по мониторингу за туляремией, клостридиозами, боррелиозом, легионеллезом, листериозом, а также Национальный центр верификации диагностической деятельности и Национальный центр, осуществляющий функции государственной коллекции. На базе ГНЦ ПМБ и при его непосредственном участии прошел ряд международных научных форумов по линии СНГ и БРИКС, несколько конференций молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Центр успешно развивает исследования в областях системной биологии, коллекционной деятельности, разрабатывает проблему биодетекции и диагностики инфекционных поражений человека.

Диагностика инфекционных заболеваний бактериальной этиологии, контроль качества воды и пищи, биотехнологические разработки в обязательном порядке включают общую схему микробиологических исследований: отбор и подготовку проб, использование транспортных сред для доставки материала в Центры индикации или референс-центры, выделение патогенного агента с помощью биологической пробы или использования элективных и селективных питательных сред. Наиболее перспективными отечественными разработками являются хромогенные питательные среды и среды для выявления антибиотикорезистентности, на что направлены усилия ГНЦ ПМБ, уже выпускающего более 70 наименований сред в объеме более 120 тонн сухих сред в год и занимая более 50% рынка страны.

Постановка биопроб для изолирования патогенов, вызвавших заболевания в последние годы, становится все менее востребованным методом. Практика расследования вспышек инфекционных заболеваний в России свидетельствует о необходимости использования данного метода для повышения эффективности диагностической деятельности.

Во многих случаях только благодаря использованию биопроб в ГНЦ ПМБ были выделены живые патогены. Следует отметить, что ученые ГНЦ ПМБ ежегодно участвуют в исследовании десятков вспышек инфекционных заболеваний в России, используют самые современные достижения молекулярной биологии, генетики и, конечно, постановку биопроб.

Для лабораторий разного уровня, в том числе слабо оснащенных, в Центре разработаны эффективные средства диагностики – бесприборные иммуносенсоры (иммунохроматографические (ИХ) тест-системы) на основе собственных парных моноклональных антител. Создана технологическая линия по выпуску ИХ-тестов, полностью на основе отечественных комплектующих. ИХ-тесты уже разработаны, зарегистрированы и выпускаются для следующих возбудителей: холерный вибрион О1 группы «Тест-полоска *V. cholerae* О1», холерный токсин «Тест-полоска *V. cholerae* tox+», легионеллы «Тест-полоска *L. pneumophila* 1», листерии «Тест-полоска *Listeria spp.*», чума – выявление антител «ИХТ-F1», чума – выявление клеток, сибирская язва – споровый антиген, сибирская язва – вегетативные клетки, туляремиальный микроб – клетки, возбудитель гриппа – выявление серотипов А, В.

Из современных, наиболее быстро развивающихся средств диагностики следует отметить аптамеры – фрагменты ДНК, специфичные к мишеням и отобранные методами высокопроизводительного скрининга *in vitro* из библиотек олигонуклеотидов. В ФБУН ГНЦ ПМБ впервые в России получены аптамеры к патогенному штамму *E. coli* О157:H7, ботулотоксину и шига-токсину и разработаны тест-системы на их основе.

В ГНЦ ПМБ разработаны мультиплексные наборы для идентификации шигатоксинпродуцирующих штаммов кишечной палочки (зарегистрированы и выпускаются), тест-системы для одновременного выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии в режиме реального времени («MULTI-FLU», зарегистрирована и выпускается), системы ПЦР дифференциации подвидов *Francisella tularensis* с помощью одного праймера.

В Центре активно занимаются проблемой лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний и ищут новые пути ее преодоления. В широком спектре методов борьбы с антибиотикорезистентностью бактериофаги

занимают особое место в силу своих уникальных свойств как живых объектов и большого научного и клинического материала, полученного при их применении. Основой для реализации фагового направления явилась собранная в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ «Оболensk») на базе ФБУН ГНЦ ПМБ представительная коллекция бактериофагов, активных против возбудителей пищевых и госпитальных инфекций: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* серотипов *Enteritidis*, *Typhimurium*, *Infantis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и других, а также против возбудителей особо опасных бактериальных инфекций.

Одним из важных направлений научных разработок ГНЦ ПМБ являются исследования по созданию новых вакцин против особо опасных инфекций, которые постепенно должны заменить традиционные живые. Разработана, прошла успешные клинические испытания чумная химическая микрокапсулированная вакцина для нужд Минобороны России на основе рекомбинантных антигенов (в стадии Госрегистрации), разработан прототип химической вакцины против шигатоксинпродуцирующих эшерихиозов, живые чумная и сибиреязвенная вакцины со сниженной реактогенностью, прототип химической туляремиальной вакцины, ряд образцов ДНК вакцин и вакцин против инфекций, передающихся клещами на основе рекомбинантных белков слюны клещей. Разработан целый ряд современных методов оценки напряженности иммунитета к особо опасным инфекциям бактериальной природы, являющихся основой для определения тактики вакцинации людей против соответствующих заболеваний.

И.А.Дятлов

Директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Роспотребнадзора,
академик РАН, доктор медицинских наук, профессор

И.Г.Говорунов

Заведующий отделом информационных технологий
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, к.б.н.

Диагностическая значимость рекомбинантного белка GroEL FTT_1696 для выявления противотуляремийных антител

А.А.Горбатов, Е.А.Панферцев, Е.В.Баранова, П.В.Соловьев, Т.И.Комбарова,
Г.М.Титарева, Т.Б.Кравченко, А.Н.Мокриевич, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболенск, Российская Федерация

Для серодиагностики туляремийной инфекции традиционно применяют тесты РНГА и РА. Интерпретация результатов в этих тестах часто затруднена, поэтому существует необходимость совершенствования методов диагностики туляремийной инфекции. Согласно современным представлениям, основную роль в гуморальном иммунитете при туляремии играют антитела против липополисахарида (ЛПС). Однако в некоторых случаях не удается обнаружить антитела к этому антигену, поэтому исследователи ведут поиск других иммунодоминантных антигенов. Нами изучен диагностически значимый рекомбинантный белок GroEL FTT_1696 (FTT_1696), являющийся цитоплазматическим белком шапероном I типа возбудителя туляремии, имеющим высокую иммуногенность и специфичность.

Ключевые слова: туляремия, вакцина, серодиагностика, антитела

Для цитирования: Горбатов А.А., Панферцев Е.А., Баранова Е.В., Соловьев П.В., Комбарова Т.И., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Бикетов С.Ф. Диагностическая значимость рекомбинантного белка GroEL FTT_1696 для выявления противотуляремийных антител. Бактериология. 2017; 2(3): 9–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-9-15

Diagnostic significance of the recombinant protein GroEL FTT_1696 for the identification of antitulematic antibodies

A.A.Gorbatov, E.A.Panfertsev, E.V.Baranova, P.V.Solov'ev, T.I.Kombarova,
G.M.Titareva, T.B.Kravchenko, A.N.Mokrievich, S.F.Biketov

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation

The tests of RNGA and RA are traditionally used for serodiagnosis of tularemia infection. Interpretation of the results is often difficult in these tests, so there is a need to improve methods for diagnosing tularemia infection. According to modern concepts, antibodies against lipopolysaccharide (LPS) play the main role in humoral immunity in tularemia. However, in some cases it is not possible to detect antibodies to this antigen, so researchers are searching for other immunodominant antigens. We studied a diagnostically significant recombinant protein GroEL FTT_1696 (FTT_1696), which is a cytoplasmic protein of type I chaperone of the tularemia pathogen having high immunogenicity and specificity.

Keywords: tularemia, vaccine, serodiagnosis, antibodies

For citation: Gorbatov A.A., Panfertsev E.A., Baranova E.V., Solov'ev P.V., Kombarova T.I., Titareva G.M., Kravchenko T.B., Mokrievich A.N., Biketov S.F. Diagnostic significance of the recombinant protein GroEL FTT_1696 for the identification of antitulematic antibodies. Bacteriology. 2017; 2(3): 9–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-9-15

Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция, вызываемая грамотрицательной коккобациллой *Francisella tularensis*. Высокая инфекционность для человека и

летальность при аэрогенном инфицировании являются причинами отнесения туляремии к особо опасным инфекциям. Широкое распространение природных очагов этого забо-

Для корреспонденции:

Горбатов Алексей Александрович, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: gorbatov1986@mail.ru

Статья поступила 08.08.2017 г., принята к печати 26.09.2017 г.

For correspondence:

Alexey A. Gorbatov, Junior Researcher of the Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: gorbatov1986@mail.ru

The article was received 08.08.2017, accepted for publication 26.09.2017

левания на территории РФ делает актуальным создание современных иммунодиагностических систем для серодиагностики туляремии.

Фундаментальной проблемой серодиагностики инфекционных заболеваний является подбор антигенов, обеспечивающих высокий уровень специфичности анализа с надежным диагностическим критерием инфекционного или поствакцинального процесса.

Как правило, для серодиагностики туляремийной инфекции как у людей, так и у животных в эндемичных районах применяют давно разработанные тесты РНГА и РА [1], в которых используется комплексный туляремийный антиген, представляющий собой взвесь инактивированных бактерий *F. tularensis*. Однако интерпретация результатов в этих тестах часто затруднена, поэтому существует необходимость совершенствования методов диагностики туляремийной инфекции для повышения эффективности выполняемых анализов.

Согласно современным представлениям, основную роль в формировании гуморального иммунитета при туляремии играет липополисахарид (ЛПС) – главный компонент клеточной стенки *F. tularensis* [2–4]. Поэтому большинство современных серотестов для диагностики туляремии разрабатывается с использованием в качестве антигена ЛПС *F. tularensis*. Наличие специфических антител к ЛПС туляремийного микроба является одним из критериев наличия инфекционного или поствакцинального процессов. Однако в некоторых случаях (6–10%) не удается обнаружить антитела к этому антигену, поэтому исследователи ведут поиск других иммунодоминантных антигенов [5, 6]. К настоящему времени выделен ряд белков, перспективных для иммунодиагностики туляремии: пируват дегидрогеназа E2 (FTT_1484), дигидролипоамид сукцинилтрансфераза (FTT_077), белок-шаперон GroEL (FTT_1696), ацетил-СоА карбоксилаза (FTT_0472), гипотетический белок (FTT_1441) и 50S рибосомальный белок L7/L12 (FTT_0143) [7]. Наиболее иммунореактивным из них является белок-шаперон GroEL FTT_1696.

Антиген FTT_1696 является цитоплазматическим белком шапероном I типа GroEL возбудителя туляремии. На локализацию белка *F. tularensis* указывают как результаты биоинформативных расчетов [8], так и экспериментальные исследования по иммунизации лабораторных животных. Результаты биоинформативного поиска, проведенного по базе данных белковых последовательностей NCBI методами blastp и PSI-BLAST, показали, что белок FTT_1696 специфичен для рода *Francisella* [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q5NEE1.1>]. Предполагается, что этот белок участвует в защите клеточных белков от денатурации. Под воздействием различных стрессовых факторов (высокая температура, гипоксия, ультрафиолетовое облучение, изменение pH среды, изменение молярности среды, действие токсичных химических веществ, тяжелых металлов и т.д.) в клетках усиливается синтез белков теплового шока, в том числе GroEL FTT_1696. Имея высокое сродство к гидрофобным участкам частично денатурированных белков, они могут препятствовать их полной денатурации и восстанавливать нативную конформацию белков. Таким образом, в связи с данными исследований, показавших высокую иммуноген-

ность белка FTT_1696, а также отсутствие гомологии с белками бактерий других родов данный белок представляет значительный интерес как целевой антиген для серодиагностики туляремии.

Цель работы – изучить диагностическую значимость рекомбинантного белка FTT_1696 для выявления противотуляремийных антител при инфекционном и вакцинальных процессах.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовано 8 штаммов *F. tularensis* 4 подвидов: *F. tularensis subsp. tularensis* (Schu, A-Cole), *subsp. holarctica* (503, A-1045, 15НИИЭГ), *subsp. mediaasiatica* (120, A-678) и *subsp. novicida* (Utah112) и 3 штамма гетерологичных микроорганизмов *L. pneumophila*, *B. abortus*, *E. coli* из музея живых культур «ГКПМ-Оболensk». Все исследования с вирулентными и вакцинными штаммами выполнялись в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами [9, 10]. Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37°C на плотной питательной среде FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ). Штамм *B. abortus* культивировали при температуре 37°C на плотной питательной бруцеллагар (ФБУН ГНЦ ПМБ). Штамм *E. coli* культивировали при температуре 37°C в жидкой и на плотной питательной среде LB (Himedia Laboratories Pvt. Limited, Индия).

Получение бактериальных лизатов. Лизаты термоинaktivированных клеток для иммунологических исследований получали с помощью ультразвукового дезинтегратора BANDELIN Sonopuls 3200. Взвеси микробов с концентрацией 5×10^9 м.к./мл обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут при +5°C.

Животные. В экспериментах с животными, одобренными комиссией по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ [11, 12], были использованы мыши инбредных линий BALB/c(H2d) (6–8 недель, масса 18–20 г), крысы линии Wistar (5–7 недель, масса 20–24 г), морские свинки (5–7 недель, вес 350–450 г) и кролики породы Шиншилла (5–7 недель, масса 1500–2000 г).

Кроликов породы Шиншилла иммунизировали подкожно вакцинным штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ с неполным адьювантом Фрейнда в соотношении 1 : 1 дозой 5×10^3 КОЕ, а также для иммунизации использовали рекомбинантный белок FTT_1696 в дозе 20 мкг с неполным адьювантом Фрейнда в соотношении 1 : 1.

Мышей иммунизировали подкожно суспензией клеток *F. tularensis* 15НИИЭГ (30 КОЕ). Через 28 дней после вакцинации мышей заражали вирулентными штаммами *F. tularensis* (*F. tularensis subsp. holarctica* 503, *F. tularensis subsp. holarctica* 1045, *F. tularensis subsp. mediaasiatica* 678, *F. tularensis subsp. mediaasiatica* 120 в дозе 1×10^3 КОЕ).

Крыс Wistar и морских свинок иммунизировали подкожно однократно в дозе 1×10^3 КОЕ/животное вакцинным штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ. Затем заражали вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 (*subsp. holarctica*), *F. tularensis* 678 (*subsp. mediaasiatica*) и *F. tularensis* Schu (*subsp. tularensis*) в дозе 1×10^6 КОЕ.

Кроме того, кроликов и крыс заражали вирулентными штаммами без предварительной иммунизации: кроликов – штаммами *F. tularensis* 503, 1045 (*subsp. holarctica*), 678, 120

(*subsp. mediaasiatica*) в дозе 1×10^6 КОЕ; крыс – штаммами 503, 678 и Schu (*subsp. tularensis*) в дозе 1×10^5 КОЕ.

Получение сывороток

Забор крови у кроликов проводили на 3, 7, 14, 21 и 26-е сутки после иммунизации.

У мышей, крыс и морских свинок забор крови проводили на 28-й день после вакцинации и через 28 дней после заражения.

Кровь от больных туляремией людей ($n = 6$) получали на 14–28-й день заболевания. От пациентов, вакцинированных живой туляремийной вакциной ($n = 160$), забор крови проводили на 28-й день после вакцинации.

Сыворотки из полученной крови выделяли общепринятым методом, разделяли на аликвоты и хранили при -18°C до использования.

В качестве контрольных сывороток использовали нормальные (неиммунные) сыворотки человека, кролика, крысы, морской свинки и мыши.

Получение рекомбинантного белка FTT_1696

Поиск нуклеотидной и аминокислотной последовательности FTT_1696 (Chaperonin GroEL) проводили с использованием баз данных на портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Поиск аналогов целевых генов и белков проводился с помощью алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов проводились с помощью пакета программ Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation).

Очищенный фрагмент ДНК размером 1635 п.о. обрабатывали рестриктазами NdeI + XhoI и лигировали с предварительно обработанной этими же рестриктазами векторной плазмидной ДНК pET32b (Novagen). Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5 α . Отбор трансформантов проводили на плотной питательной среде LA, содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Для подтверждения нуклеотидной последовательности клонированного гена FTT_1696 было проведено секвенирование гена с использованием праймеров к T7 промотору и T7 терминатору векторной плазмиды pET32b. Полученной рекомбинантной плазмидной ДНК pETFTT1696 трансформировали компетентные клетки *E. coli* B121(DE3).

Экспрессию белка FTT_1696 проводили в клетках рекомбинантного штамма *E. coli* B121(DE3)/pETFTT1696 по методике фирмы-производителя (Novagen) в жидкой среде LB в присутствии 50 мкг/мл ампициллина и 1мМ ИПТГ в течение 4 ч при 37°C . Экспрессию рекомбинантного белка FTT_1696 детектировали при помощи вестерн-блот анализа с использованием моноклональных антител к полигистидиному домену гибридного белка.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури-Фолина [13].

Масс-спектрометрия

Подлинность рекомбинантного белка FTT_1696 проверяли методом масс-спектрометрии. Анализируемые белки разделяли электрофоретически. Гидролиз белков из геля проводили трипсином. Полученные пептиды анализировали методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения. Хроматографию пептидов проводили на нанопотоковом хроматографе Easy-nLC1000 (Thermo Scientific, США) с ис-

пользованием капиллярной колонки с обращенной фазой C18 (размер частиц 2,6 мкм, пор – 100 Å).

Элюируемые пептиды анализировали на масс-спектрометре Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Германия). Ионизацию проводили методом электрораспыления. Фрагментацию ионов проводили методом диссоциации, активированной соударением. Полученные массы пептидов и спектры фрагментации анализировали с помощью программы PeaksStudio 7.5.

Электрофорез в денатурирующих условиях

Степень чистоты рекомбинантного белка FTT_1696 и состав микробных лизатов клеток оценивали путем разделения белков в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по Laemmli (Laemmli U.K. 1970).

Иммуноферментный анализ

ЛПС туляремийного микроба и рекомбинантный белок FTT_1696 тестировали в ИФА с сыворотками животных и человека. Анализ проводили по стандартной методике [14]. В качестве антигена, сорбированного на планшет, использовали FTT_1696, ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации 1 мкг/лунку. Антивидовые конъюгаты к IgG использовали по методике производителя.

Иммуноблоттинг

Лизаты микробных клеток и рекомбинантный белок FTT_1696 тестировали при помощи иммуноблоттинга [15]. Электроперенос белков осуществляли на нитроцеллюлозную мембрану Hybond C полусухим методом.

Иммунохроматография

Для производства лабораторных серий иммунохроматографических тестов использовали материалы фирмы MDI (Индия). На основе наночастиц золота, конъюгированных с белком G, изготовили 2 типа ИХ-тестов. В тестовую зону каждого типа тестов вносили по одному из антигенов: ЛПС *F. tularensis* и рекомбинантный белок FTT_1696. На полученных тестах проводили анализ сывороток от животных и человека в разведении 1/20.

Результаты и обсуждение

В ходе данных работ получен штамм-продуцент *E. coli* B121(DE3)/pETFTT1696, который содержал в составе экспрессирующего вектора pET32b (Novagen USA) фрагмент ДНК *F. tularensis*, размером 1635 п.о., кодирующий синтез белка FTT_1696 с молекулярной массой 58 кДа.

Рекомбинантный белок, выделенный на металло-хелатном сорбенте, представлял собой гибридный белок с полигистидиновым доменом (his-6) молекулярной массой около 58 кДа. Анализ белка FTT_1696 с помощью электрофореза показал, что он практически свободен от примесей других белков: чистота препарата по белку составила 95–98%, молекулярная масса – 58 кДа (рис. 1, 2).

Масс-спектрометрический анализ показал, что полученный рекомбинантный белок гомологичен белку GroEL FTT_1696 из штаммов различных подвидов *F. tularensis*.

Анализ термоллизатов биомассы штаммов каждого из подвидов *F. tularensis subs. tularensis* (Schu, B-399 A-Cole), *subsp. holarctica* (503, A-1045), *subsp. mediaasiatica* (120, A-678) и *subsp. novicida* (Utah112) показал, что белковый профиль из

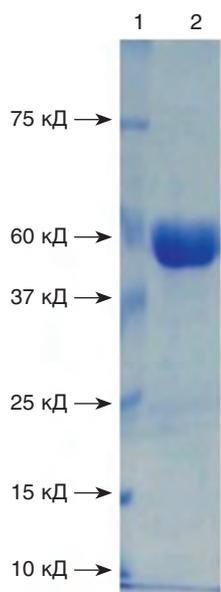


Рис. 1. Электрофореграмма рекомбинантного белка FTT_1696: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – белок FTT_1696.



Рис. 2. Иммуноблот препарата рекомбинантного белка FTT_1696 с антителами к his(6)-домену.

клеток всех вирулентных штаммов не отличался от препарата из вакцинного штамма (рис. 3). Анализ белка FTT_1696 и термолизатов штаммов *F. tularensis* с гипериммунной кроличьей сывороткой к рекомбинантному белку FTT_1696 позволил выявить наличие специфических антител к этому белку с молекулярной массой около 58 кД, а также к белку аналогичного молекулярного веса в спектре белковых профилей всех исследованных штаммов *F. tularensis* (рис. 4). В качестве контроля были использованы образцы термолизатов, приготовленные из биомассы *B. abortus*, *E. coli*, в которых не были обнаружены иммунореактивные белки.

Оценку иммунологической активности белка FTT_1696 проводили методом ИФА с сыворотками крови вакциниро-

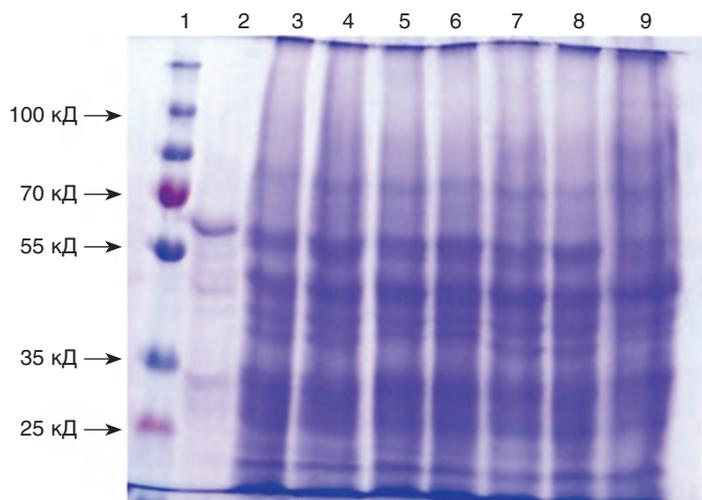


Рис. 3. Электрофореграмма рекомбинантного белка FTT_1696 и термолизатов бактериальных клеток штаммов *F. tularensis*: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – белок FTT_1696; 3 – *F. tularensis* Schu; 4 – *F. tularensis* A-Cole; 5 – *F. tularensis* 503; 6 – *F. tularensis* A-1045; 7 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ; 8 – *F. tularensis* 120; 9 – *F. tularensis* 678.

ванных против туляремии людей ($n = 160$). Данные ИФА показали, что 50% исследуемых сывороток имели специфические титры антител к FTT_1696 в разведении от 1 : 400 до 1 : 600. Эти же сыворотки были исследованы на наличие специфических антител к ЛПС *F. tularensis*. В среднем титры специфических антител к FTT_1696 были в 2–3 раза ниже, чем к ЛПС. У 6% исследуемых сывороток не удалось обнаружить специфических антител к туляремийному ЛПС, однако были обнаружены специфические антитела к FTT_1696, в то время как 10% сывороток с отрицательными титрами к белку имели специфические антитела к ЛПС. В сыворотках крови людей, перенесших туляремийную инфекцию, были обнаружены специфические антитела как к ЛПС *F. tularensis*, так и к белку FTT_1696 в диагностически значимых титрах.

В связи с тем, что имеющаяся выборка материала, полученного от людей, больных туляремией, была мала, мы моделировали течение туляремийной инфекции на животных. Нами были исследованы сыворотки крови экспериментальных животных – кроликов, крыс, морских свинок, мышей. В качестве отрицательного контроля были использованы сыворотки животных, не имевших контакта с возбудителем туляремии.

Изучение динамики нарастания титра специфических антител к ЛПС и белку FTT_1696 в сыворотке крови кроликов, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ, проводили методом ИФА. Установлено, что нарастание титра антител у животных к белку FTT_1696 идет одновременно с нарастанием титра антител к ЛПС *F. tularensis*.

На рисунке 5 представлены данные исследования динамики гуморального иммунного ответа кроликов в разные сроки после проведения вакцинации.

Таким образом, показано, что как у людей, так и у животных титр специфических антител к белку FTT_1696 ниже, чем к туляремийному ЛПС, однако его диагностическое значение очевидно.

В таблице представлены данные исследования титров антител к антигенам туляремийного микроба у лаборатор-

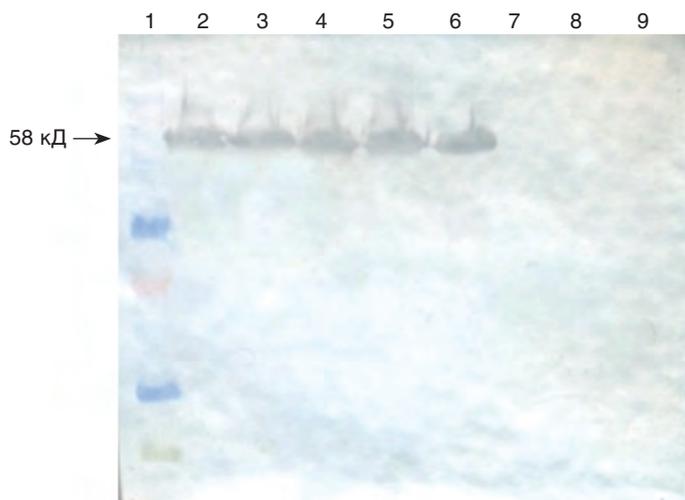


Рис. 4. Иммуноблот гипериммунной кроличьей сыворотки к рекомбинантному белку FTT_1696 с УЗД бактерий: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – белок FTT_1696; 3 – УЗД *F. tularensis* Schu; 4 – УЗД *F. tularensis* 503; 5 – УЗД *F. tularensis* 120; 6 – УЗД *F. tularensis* 15 НИИЭГ; 7 – УЗД *L. pneumophila*; 8 – УЗД *B. abortus*; 9 – УЗД *E. coli*.

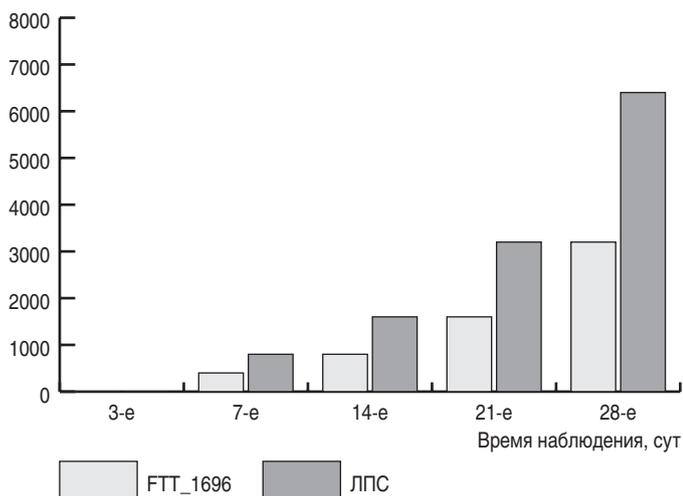


Рис. 5. Динамика нарастания титров специфических антител к антигенам туляремийного микроба у кроликов при иммунизации штаммом *F. tularensis* 15НИИЭГ.

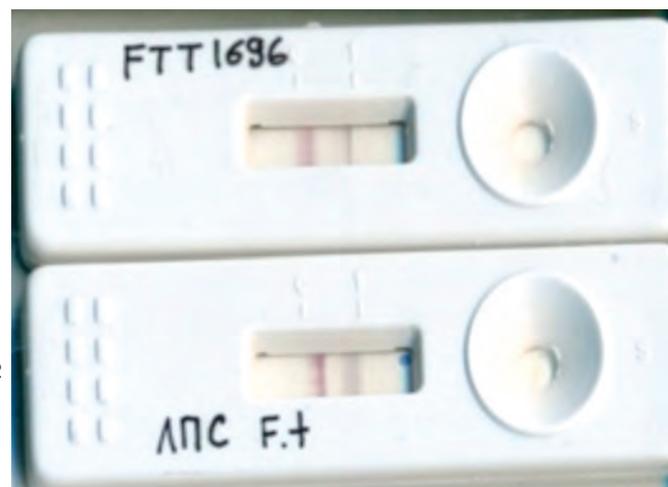


Рис. 6. Лабораторные образцы иммунохроматографических тестов для серодиагностики туляремии. 1 – тест на основе рекомбинантного белка FTT_1696; 2 – тест на основе ЛПС *F. tularensis*.

ных животных при иммунизации и заражении вирулентными штаммами *F. tularensis* разных подвидов.

В экспериментах на лабораторных животных установлено, что специфические антитела к туляремийному ЛПС определялись у 100% иммунизированных и зараженных животных. Антитела к FTT_1696 выявлялись у 70% иммунизированных и зараженных животных. В экспериментах по изучению длительности иммунитета в сыворотках морских свинок и мышей наблюдали сохранение титра специфических антител как к туляремийному ЛПС, так и к белку FTT_1696 вплоть до 180 суток (период наблюдений).

Изготовленные образцы ИХ-тестов были испытаны на выборке сывороток крови данных групп лабораторных животных. Данные иммунохроматографического тестирования сравнивали с данными ИФА. В качестве характеристики количества специфических антител в сыворотке использовали величину ее разведения. В ходе испытаний установлено, что сыворотки, которые по результатам ИФА имели положительную реакцию в разведении 1/400 и выше, при иммунохроматографическом тестировании также показали положительные результаты (рис. 6).

Таким образом, результаты данной работы свидетельствуют о том, что полученный нами рекомбинантный белок

Таблица. Средние значения реципрокных титров антител к антигенам туляремийного микроба у различных лабораторных животных при иммунизации и заражении вирулентными штаммами *F. tularensis* разных подвидов

Вид лабораторных животных	Иммунизирующий штамм <i>F. tularensis</i> spp. <i>holarctica</i>	Заражающий штамм <i>F. tularensis</i> , <i>subsp.</i>	Реципрокные титры антител к антигенам <i>F. tularensis</i>	
			FTT_1696	ЛПС
Мыши	контроль	–	отр	отр
	15НИИЭГ	–	200	350
	15НИИЭГ	A-1045, <i>spp. holarctica</i>	400	1200
		A-678, <i>spp. mediaasiatica</i>	600	1000
		120, <i>spp. mediaasiatica</i>	600	1000
Schu, <i>spp. tularensis</i>	600	700		
Морские свинки	контроль	–	отр	отр
	15НИИЭГ	–	400	666,6
	15НИИЭГ	503, <i>spp. holarctica</i>	400	1200
Крысы	15НИИЭГ	A-678, <i>spp. mediaasiatica</i>	400	2000
		–	400	333,3
	15НИИЭГ	503, <i>spp. holarctica</i>	400	800
		A-678, <i>spp. mediaasiatica</i>	400	1200
		Schu, <i>spp. tularensis</i>	400	2000
		503, <i>spp. holarctica</i>	400	1600
		A-678, <i>spp. mediaasiatica</i>	400	1333,3
120, <i>spp. mediaasiatica</i>	400	1066,7		
Schu, <i>spp. tularensis</i>	400	2666,7		
Кролики	контроль	–	отр	отр
	15НИИЭГ	–	400	6400
	15НИИЭГ	503, <i>spp. holarctica</i>	400	6400
		A-1045, <i>spp. holarctica</i>	400	12800
		503, <i>spp. holarctica</i>	400	19200
A-678, <i>spp. mediaasiatica</i>		400	4266	
–	120, <i>spp. mediaasiatica</i>	400	5333	

F. tularensis FTT_1696 является перспективным иммунодиагностическим антигеном, который наряду с ЛПС *F. tularensis* можно использовать как для иммуноферментного метода при оценке титра специфических антител, так и в ИХ-тестах для ускоренной серодиагностики туляремии.

Литература

1. Сырова НА, Терешкина НЕ, Девдариани ЗЛ. Современное состояние иммунодиагностики туляремии. Проблемы особо опасных инфекций. 2008;3(97):12-5.
2. Cowley SC, Elkins KL. Immunity to francisella. Front Microbiol. 2011 Feb 16;2:26. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00026
3. Fulop M, Mastroeni P, Green M, Titball RW. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of Francisella tularensis. Vaccine. 2001 Aug 14;19(31):4465-72.
4. Fulop M, Manchee R, Titball R. Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from Francisella tularensis in the induction of immunity against tularemia. Vaccine. 1995;13(13):1220-5.
5. Eyles JE, Unal B, Hartley MG, Newstead SL, Flick-Smith H, Prior JL, et al. Felgner Immunodominant Francisella tularensis antigens identified using proteome Proteomics. 2007;7(13):2172-83. DOI: 10.1002/pmic.200600985
6. Twine SM, Petit MD, Fulton KM, House RV, Conlan JW. Immunoproteomics analysis of the murine antibody response to vaccination with an improved Francisella tularensis live vaccine strain (LVS). PLoS One. 2010 Apr 2;5(4):e10000. DOI: 10.1371/journal.pone.0010000
7. Sara LN, Twine KM, Twine SM. The Francisella tularensis proteome and its recognition by antibodies. Front Microbiol. 2011 Jan 7;1:143. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00143
8. Henderson B, Allan E, Coates AR. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. Infect Immun. 2006;74(7):23693-706. DOI: 10.1128/IAI.01882-05
9. СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности». М., 2003.
10. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности». М., 2008.
11. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2010, 48 с.
12. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 №18713) 2010, 22 с.
13. Lowry OH, Rosenbrough NR, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol. J Biol Chem. 1951;193:115-9.
14. Егоров АМ, Осипов АП, Дзантиев ББ, и др. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991, 288 с.
15. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunoblotting: Current status and outlook. J Immunol Methods. 1984 Sep 4;72(2):313-40.

References

1. Syrova NA, Tereshkina NE, Devdariani ZL. Current State of Tularemia Immunodiagnosics. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2008;3(97):12-5. (In Russian).
2. Cowley SC, Elkins KL. Immunity to francisella. Front Microbiol. 2011 Feb 16;2:26. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00026
3. Fulop M, Mastroeni P, Green M, Titball RW. Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of Francisella tularensis. Vaccine. 2001 Aug 14;19(31):4465-72.

4. Fulop M, Manchee R, Titball R. Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from Francisella tularensis in the induction of immunity against tularemia. Vaccine. 1995;13(13):1220-5.
5. Eyles JE, Unal B, Hartley MG, Newstead SL, Flick-Smith H, Prior JL, et al. Felgner Immunodominant Francisella tularensis antigens identified using proteome Proteomics. 2007;7(13):2172-83. DOI: 10.1002/pmic.200600985
6. Twine SM, Petit MD, Fulton KM, House RV, Conlan JW. Immunoproteomics analysis of the murine antibody response to vaccination with an improved Francisella tularensis live vaccine strain (LVS). PLoS One. 2010 Apr 2;5(4):e10000. DOI: 10.1371/journal.pone.0010000
7. Sara LN, Twine KM, Twine SM. The Francisella tularensis proteome and its recognition by antibodies. Front Microbiol. 2011 Jan 7;1:143. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00143
8. Henderson B, Allan E, Coates AR. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. Infect Immun. 2006;74(7):23693-706. DOI: 10.1128/IAI.01882-05
9. СП 1.3.1285-03 «Safe handling of microorganisms I–II pathogenicity groups». Moscow, 2003. (In Russian).
10. СП 1.3.2322-08 «Safe handling of microorganisms III–IV pathogenicity groups». Moscow, 2008. (In Russian).
11. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union for the protection of animals used for scientific purposes. St. Petersburg, 2010, 48 p. (In Russian).
12. The order of the health Ministry of the Russian Federation dated 23.08.2010 No. 708н "On approval of Rules for laboratory practice" (Registered in the Ministry of justice 13.10.2010 No. 18713), 2010, 22 p. (In Russian).
13. Lowry OH, Rosenbrough NR, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol. J Biol Chem. 1951;193:115-9.
14. Егоров АМ, Осипов АП, Дзантиев ББ, et al. Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza [Theory and practice of enzyme immunoassay]. Moscow: "Vysshaya shkola" Publ., 1991, 288 p. (In Russian).
15. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunoblotting: Current status and outlook. J Immunol Methods. 1984 Sep 4;72(2):313-40.

Информация об авторах:

Панферцев Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Баранова Евгения Владимировна, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Соловьев Павел Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Титарева Галина Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Кравченко Татьяна Борисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Бикетов Сергей Федорович, заведующий отделом иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Information about authors:

Evgeniy A. Panfertsev, PhD, Senior Researcher of the Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Evgenia V. Baranova, PhD, Leading Researcher of the Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Pavel V. Solov'yev, PhD, Senior Researcher of the Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Tatyana I. Kombarova, PhD, Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Galina M. Titareva, PhD, Senior Researcher of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Tatyana B. Kravchenko, PhD, Senior Researcher of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Alexander N. Mokrievich, Dr. Sci., Head of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Sergey F. Biketov, PhD, Head of the Department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

НОВОСТИ НАУКИ

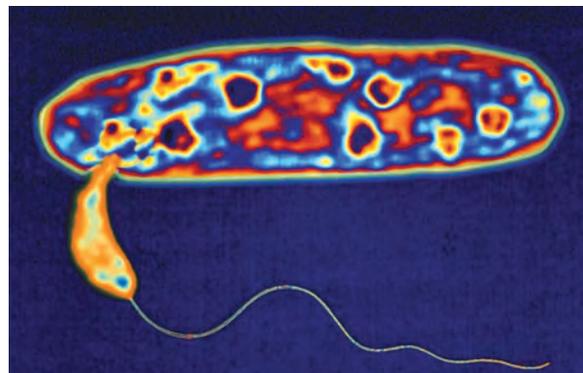
Бактерии-хищники против болезнетворных микроорганизмов устойчивых к антибиотикам

Новое исследование показывает, что штамм бактерий способен убивать пневмонию внутри легких больных крыс.

В настоящее время антибиотикоустойчивость патогенных микроорганизмов представляет одну из главных угроз для здоровья человека и животных. Ежегодно более 700 тысяч человек умирает от антибиотикоустойчивых штаммов туберкулеза, малярии и ВИЧ/СПИДа. По прогнозам без новых эффективных препаратов против этих быстро мутирующих микробов к 2050 г. смертность от лекарственно-устойчивых инфекций достигнет 50 млн человек в год.

Профессор микробиологии из корейского Национального института науки и техники Роберт Дж. Митчелл (Robert J. Mitchell) (Ulsan National Institute of Science and Technology) занимается поисками и выращиванием так называемых хищных бактерий, которые могут найти и убить невосприимчивых к антибиотикам болезнетворных микроорганизмов непосредственно в организме человека. Первые такие бактерии были идентифицированы учеными в 1962 г. А специально созданные группой Роберта Митчелла бактерии-хищники BALOS (Bdellovibrio-and-like-organisms) или бактерии-вампиры, называемые так из-за их склонности к «высасыванию» внутренностей других бактерий.

Группа Митчелла выявляет естественных бактерий-хищников, специфичных по отношению к определенным видам болезнетворных организмов. «Диета» из одного вида патогенных бактерий усиливает «ориентацию» хищников, позволяет их размножить в количестве, достаточном для введения в организм подопытных животных. До использования этого приема в медицине далеко, в том числе по психологическим причинам. Ученым также не понятны последствия длительного пребывания бактерий-хищников в организме человека. Исследования группы Митчелла продолжаются в рамках программы Pathogen Predators Управления перспективных исследовательских программ Пентагона DARPA.



Особенности микробиоты дыхательных путей при заболеваниях респираторного тракта

Е.В.Наумкина^{1,2}, Е.В.Матущенко¹, И.И.Калитина², О.А.Абросимова², Т.В.Пядочкина², А.И.Матущенко¹

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», Омск, Российская Федерация;

²БУЗОО «Городской клинический перинатальный центр», Омск, Российская Федерация

Проведен анализ результатов микробного состава респираторного тракта у различных категорий пациентов с заболеваниями верхних и нижних отделов дыхательных путей. При изучении этиологической структуры инфекций дыхательных путей выявлены существенные различия в зависимости от возраста, локализации и тяжести патологического процесса. При этом во всех случаях доминирующим или одним из доминирующих возбудителей был *Streptococcus pneumoniae*, штаммы которого оказались неоднородны по антибиотикорезистентности. Наибольший уровень резистентности к бета-лактамам выявлен у штаммов, колонизирующих дыхательные пути новорожденных отделения реанимации; к макролидам и фторхинолонам – у штаммов, выделенных из мокроты и трахеобронхиальных смывов взрослых госпитализированных пациентов. Полученные результаты отражают локальные особенности микробного пейзажа при инфекциях дыхательных путей, дают материал для эпидемиологического анализа и определения стратегии эмпирической антимикробной терапии при различных формах инфекций дыхательных путей.

Ключевые слова: анализ инфекции дыхательных путей, *Streptococcus pneumoniae*

Для цитирования: Наумкина Е.В., Матущенко Е.В., Калитина И.И., Абросимова О.А., Пядочкина Т.В., Матущенко А.И. Особенности микробиоты дыхательных путей при заболеваниях респираторного тракта. Бактериология. 2017; 2(3): 16–20. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-16-20

Peculiarities of microbiotes of respiratory ways under respiratory tract diseases

E.V.Naumkina^{1,2}, E.V.Matushchenko¹, I.I.Kalitina², O.A.Abrosimova², T.B.Piadochkin², A.I.Matushchenko¹

¹Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;

²City Clinical Perinatal Center, Omsk, Russian Federation

Microbial composition of the respiratory tract in various categories of patients with diseases of the upper and lower respiratory tract have been analyzed. Significant differences depending on the age, localization and severity of the pathological process have been revealed during the study of etiological structure of respiratory tract infections. In all cases, *Streptococcus pneumoniae* was the dominant or one of the dominant pathogens, heterogeneous in terms of antibiotic resistance. The highest level of resistance to beta-lactam antibiotics have been found in the strains colonizing the respiratory tract of newborn resuscitation departments; to macrolides and fluoroquinolones – in strains isolated from sputum and tracheobronchial flushes of adult patients. The results reflect the local features of the microbial landscape in respiratory tract infections, provide material for epidemiological analysis and for the determination of the strategy for empirical antimicrobial therapy for various forms of respiratory tract infections.

Keywords: respiratory tract infection analysis, *Streptococcus pneumoniae*

For citation: Naumkina E.V., Matushchenko E.V., Kalitina I.I., Abrosimova O.A., Piadochkin T.B., Matushchenko A.I. Peculiarities of microbiotes of respiratory ways under respiratory tract diseases. Bacteriology. 2017; 2(3): 16–20. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-16-20

Инфекции верхних и нижних дыхательных путей продолжают оставаться одной из важнейших проблем современной медицины.

Представители нормальной микробиоты в избытке присутствуют на слизистых оболочках верхних дыхательных путей. Среди них часто встречаются и пневмотропные микроорганизмы.

Для корреспонденции:

Наумкина Елена Витальевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», заведующая лабораторией клинической микробиологии БУЗОО «Городской клинический перинатальный центр»

Адрес: 644007, Омск, ул. Герцена, 69

Телефон: (3812) 65-0488

E-mail: evn04@mail.ru

Статья поступила 01.08.2017 г., принята к печати 26.09.2017 г.

Нередко этиологическими агентами острого тонзиллофарингита являются вирусы и стрептококки, а именно, β -гемолитический стрептококк группы А (*Streptococcus pyogenes*) – 15–30%, β -гемолитические стрептококки групп С и G (5–10%); в редких случаях встречается смешанная аэробно-анаэробная микрофлора, другие бактериальные патогены – *Neisseria gonorrhoeae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Arcano-*

For correspondence:

Elena V. Naumkina, Sc.D (Med.), Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Omsk State Medical University; Head of the Clinical Microbiology Laboratory of the City Clinical Perinatal Center

Address: 69 Herzen str., Omsk, 644007, Russian Federation

Phone: (3812) 65-0488

E-mail: evn04@mail.ru

The article was received 01.08.2017, accepted for publication 26.09.2017

bacterium haemolyticum (ранее *Corynebacterium haemolyticum*), *Yersinia enterocolitica*, *Treponema pallidum*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* [1].

Первое место среди заболеваний органов дыхания человека занимает хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ). Второй по распространенности болезнью органов дыхания является бронхиальная астма (БА). Одним из важных факторов обострений БА и ХОБЛ являются инфекционные агенты.

Наиболее частыми возбудителями ХОБЛ являются *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* и *C. pneumoniae* [2].

Серьезную медико-социальную проблему для многих стран мира представляет также внебольничная пневмония (ВП). Из многочисленных микроорганизмов, колонизирующих верхние дыхательные пути, лишь некоторые, обладающие повышенной вирулентностью, способны при попадании в нижние дыхательные пути вызывать воспалительную реакцию [3].

Нозокомиальная пневмония (НП) является одним из наиболее часто встречаемых в стационаре инфекционных заболеваний и самым частым – у больных отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). По данным Роспотребнадзора, НП в России ежегодно переносят до 8% пациентов, или 2 млн больных [4]. Колонизация ротоглотки *Streptococcus pneumoniae*, анаэробами, реже *Haemophilus influenzae* характерна для многих здоровых людей. Между тем, колонизация ротоглотки грамотрицательными бактериями (ГОб), и прежде всего *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter spp.*, в норме встречается крайне редко. Вероятность орофарингеальной колонизации *P. aeruginosa* и энтеробактериями возрастает по мере увеличения длительности пребывания в стационаре и (или) увеличения степени тяжести заболевания. При этом риск развития НП у пациентов с колонизацией верхних дыхательных путей ГОб возрастает почти в 10 раз по сравнению с лицами без заселения ротоглотки данными микроорганизмами [1, 5].

Наиболее часто НП вызывается аэробными грамотрицательными микроорганизмами, такими как *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter spp.* Достаточно часто выделяются грамположительные бактерии, включая метициллинрезистентные штаммы *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Роль *Legionella pneumophila* более высока у пациентов с иммунодефицитными состояниями, в частности после трансплантации органов.

Патология дыхательной системы является одной из основных причин высокой заболеваемости и смертности новорожденных детей. По данным А.И.Алиевой с соавт. [6], при исследовании этиологической структуры пневмоний у новорожденных чаще всего выделялись грамотрицательные микроорганизмы (92%), среди которых преобладали *Pseudomonas aeruginosa* (39%), *Escherichia coli* (28%) и *Klebsiella pneumoniae* (26%). Грампозитивные возбудители были представлены стафилококками, среди которых преобладали *Staphylococcus epidermidis*, обладающие гемолитическими свойствами (36%). При затяжном течении пневмоний основным возбудителем являлась *Stenotrophomonas maltophilia*.

Таким образом, спектр бактериальных возбудителей инфекций дыхательных путей характеризуется преобладанием пневмотропных микроорганизмов и зависит от формы, локализации инфекции, возраста, особенностей в зависи-

мости от типа стационара и отделения. В связи с этим представляет интерес изучение эпидемиологических и клинико-микробиологических особенностей данной патологии с учетом региональной специфики для определения стратегии и тактики применения антибактериальных препаратов стартовой эмпирической и последующей этиотропной терапии.

Целью настоящего исследования явилось изучение микробиоты респираторного тракта при инфекциях верхних и нижних отделов дыхательных путей у различных категорий больных.

Материалы и методы

Были проанализированы результаты бактериологического исследования отделяемого верхних дыхательных путей при инфекциях данного локуса у 2062 взрослых пациентов, обследованных на амбулаторном этапе оказания медицинской помощи; 493 образцов мокроты (трахеобронхиальных смывов) у взрослых пациентов с инфекциями нижних отделов дыхательных путей, обследованных в профильном отделении стационара; 58 образцов трахеобронхиальных смывов пациентов отделения реанимации, находящихся на искусственной вентиляции легких; 475 образцов трахеобронхиальных смывов новорожденных отделения реанимации второго этапа выхаживания.

Отбор и доставка проб в лабораторию проводились в соответствии с действующими нормативными документами [7]. Материал из зева при инфекциях верхних дыхательных путей забирали натошак стерильным ватным тампоном и доставляли в лабораторию в транспортной среде Эймса в течение 2 ч. Пробы мокроты и трахеобронхиальных смывов забирались в стерильные пластиковые емкости.

Посев материала проводился в каждом случае на оптимальный для выделения пневмотропных микроорганизмов набор питательных сред (5% кровяной агар, шоколадный агар, желточно-солевой агар, среда Эндо, среда Сабуро) количественным методом, инкубацию проводили в термостате при 37°C и CO₂ инкубаторе (кровяной и шоколадный агар).

Образцы мокроты окрашивались по Граму с последующей бактериоскопией для оценки качества образца и определения преобладающего морфотипа бактерий. Культурально исследовались только те образцы мокроты, в которых под малым увеличением микроскопа при просмотре не менее 10 полей зрения было выявлено ≥25 полиморфноядерных лейкоцитов и <10 эпителиальных клеток. Доля репрезентативных образцов составила 63,2%.

Идентификация выделенных культур проводилась с использованием наиболее рационального в каждом случае набора методов (классические тесты, хромогенные среды, иммуносерологические методы, масс-спектрометрия Maldi-Tof). Антибиотикорезистентность определяли диско-диффузионным методом (EUCAST 2016, анализатор Adagio) и в необходимых случаях с помощью E-тестов.

Результаты и обсуждение

При исследовании содержимого носоглотки у амбулаторных пациентов клинически значимые микроорганизмы были выделены в 61% случаев. Среди них наиболее часто выде-

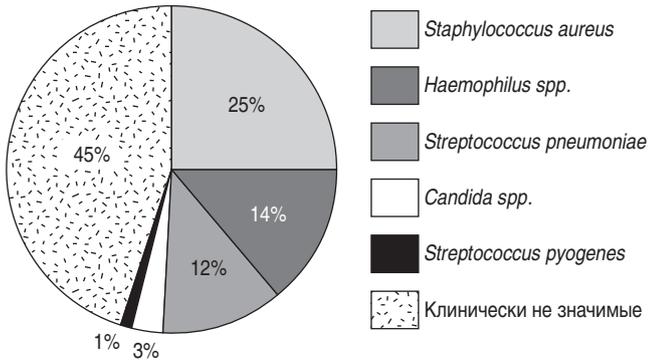


Рис. 1. Микробиота респираторного тракта при инфекциях верхних дыхательных путей у амбулаторных пациентов.

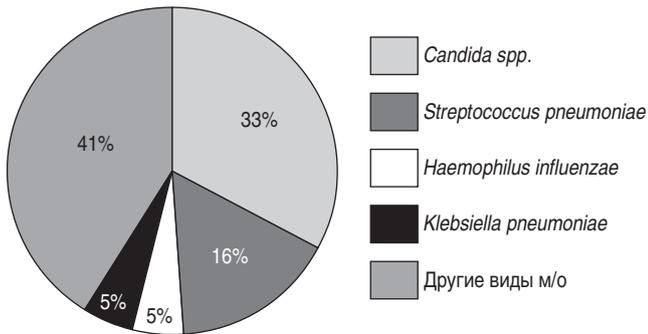


Рис. 2. Спектр микроорганизмов, выделенных из мокроты госпитализированных взрослых пациентов.

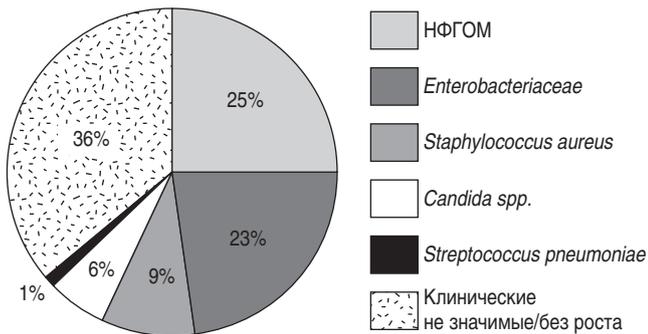


Рис. 3. Микробиота респираторного тракта пациентов реанимационного отделения (ИВЛ).

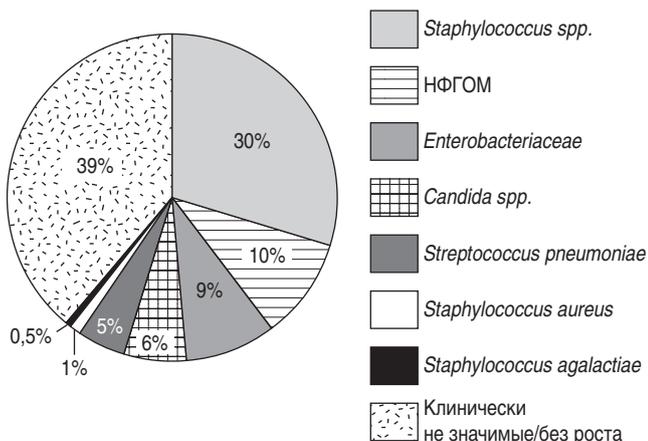


Рис. 4. Возбудители, выделенные из трахеобронхиальных смывов новорожденных отделения реанимации.

лялись *Staphylococcus aureus* (45,2%), *Haemophilus spp.* (25,1%), *Streptococcus pneumoniae* (21,7%); *Candida spp.* (5,8%); *Streptococcus pyogenes* (2,1%). В остальных случаях были выделены представители резидентной микрофлоры данного локуса (зеленящие стрептококки, коагулазонегативные стафилококки, нейссерии) а также энтерококки, представители энтеробактерий и неферментирующие грам-отрицательные микроорганизмы (НФГОМ) в концентрациях, не имеющих клинического значения (рис. 1).

У пациентов пульмонологического отделения с инфекциями нижних отделов дыхательных путей спектр бактериальных возбудителей выглядел следующим образом. Наиболее часто высевались *Candida spp.* (33,5%); *Streptococcus pneumoniae* (16%); *Haemophilus influenzae* (5,1%); *Klebsiella pneumoniae* (4,6%). Среди выделенных штаммов дрожжеподобных грибов рода *Candida* доминировали *Candida albicans* (82,9%), встречались и другие виды: *C. glabrata* (6,3%), *C. krusei* (4,2%), *C. tropicalis* (4,2%), *C. parapsilosis* (2,1%). Реже выделялись золотистый стафилококк, энтеробактерии других видов (кроме *K. pneumoniae*), НФГОМ, зеленящие стрептококки, энтерококки (рис. 2). Нужно отметить, что данный спектр возбудителей был характерен лишь для тех образцов, для которых на этапе предварительной микроскопии подтверждалась корректность забора биоматериала.

Иначе выглядел спектр возбудителей, выделенных из трахеобронхиальных смывов пациентов отделения реанимации, находящихся на искусственной вентиляции легких. На первое место здесь выходят НФГОМ (25,3%), в основном *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Pseudomonas aeruginosa*; представители семейства *Enterobacteriaceae* (22,8%), среди которых доминировала *Klebsiella pneumoniae*; далее следовали *Staphylococcus aureus* (8,86%) и *Candida spp.* (6,3%). *Streptococcus pneumoniae* выделялся лишь в единичных случаях (1,3%) (рис. 3).

И наконец, совершенно иначе выглядела этиологическая структура инфекций нижних дыхательных путей у новорожденных второго этапа выхаживания – пациентов отделения реанимации. Здесь доминировали коагулазонегативные стафилококки (29,6%), в основном *Staphylococcus epidermidis* (48,4%), *Staphylococcus haemolyticus* (22,1%), *Staphylococcus warneri* (14,7%) и *Staphylococcus hominis* (11,6%). Далее следовали НФГОМ (10,3%); энтеробактерии (8,6%, в основном *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*); *Candida spp.* (5,9%) и *Streptococcus pneumoniae* (5,1%). Значительно реже выделялись *Staphylococcus aureus* (1,4%), *Streptococcus agalactiae* (0,5%) и другие виды микроорганизмов (рис. 4).

Были выявлены также различия в распространенности антибиотикорезистентности возбудителей у данных категорий больных. Заслуживают внимания данные об антибиотикорезистентности основного патогена для данного биотопа – *S. pneumoniae*.

После широкого внедрения в клиническую практику бензилпенициллина в 1944 г. терапия пневмококковых инфекций традиционно основывалась на его высокой активности вследствие универсальной чувствительности пневмококков к данному препарату [8]. Однако уже в середине 60-х гг. в США впервые в мире из мокроты пациента с пневмонией был выделен пенициллинорезистентный пневмококк (ПРП). Позже резистентные штаммы, в том числе не только по от-

ношению к β-лактамам антибиотикам, распространились по всему миру. В последние 10 лет скорость и уровень распространения ПРП в некоторых странах носит эпидемический характер. В целом по странам Европы в последнее время чувствительность пневмококка к пенициллину составляет около 80%, а к макролидам – меньше 90% [9, 10]. В странах Азии регистрируемая частота ПРП варьирует от 20,3% в Китае до 71,5% в Корее [11, 12]. К макролидам отмечается крайне низкая чувствительность. Так, например, в Китае резистентность к последним составляет 75,4% [12], Корею – 87,6% [11], в Японии – 77,9% [13].

С целью мониторинга антибиотикорезистентности клинических штаммов пневмококка в России проводились проспективные многоцентровые микробиологические исследования ПеГАС-I (фаза «А» (1999–2000 гг.), фаза «Б» (2001–2003 гг.)), ПеГАС-II (2004–2005 гг.) и ПеГАС-III (2006–2009 гг.), позволившие выявить основные тенденции и уровни резистентности данного возбудителя к основным группам антибактериальных препаратов. Известно также, что фенотипы антибиотикорезистентности пневмококков имеют различия в зависимости от локализации инфекции. Так, частота выделения резистентных к тетрациклину пневмококков при острых синуситах достоверно выше ($p = 0,026$), чем при пневмониях. Таким образом, существенным дополнением к данным многоцентровых исследований для определения региональной стратегии эмпирической антимикробной терапии может стать анализ локальных данных о резистентности ведущего возбудителя бактериальных инфекций дыхательных путей к антибактериальным препаратам в различных категориях пациентов.

Результаты нашего анализа полученных данных (рис. 5) выявили, что среди штаммов пневмококка, выделенных из отделяемого верхних дыхательных путей у амбулаторных пациентов, частота резистентности к бензилпенициллину и цефалоспорином находится на уровне 13%. Устойчивость к 14–15-членным макролидам составила 21,8%; фторхинолонам – 3,8%; доксициклину – 6,2%. Штаммы, выделенные из мокроты и трахеобронхиальных смывов госпитализированных пациентов, были устойчивы к бензилпенициллину и цефалоспорином в среднем в 29% случаев, макролидам – в 42,5% случаев; фторхинолонам – 13,3%; доксициклину – 10,2%. Значимо более высокая резистентность также была выявлена у штаммов, колонизировавших дыхательные пути новорожденных пациентов отделения реанимации. Около 38% штаммов оказались устойчивы к бензилпенициллину и цефалоспорином, 28,7% – к макролидам, 7,7% – к фторхинолонам и 2,8% – к доксициклину. При этом во всех случаях сохранялась 100% чувствительность к карбапенемам.

Выводы

В этиологической структуре инфекций дыхательных путей имеются существенные различия в зависимости от возраста, локализации и тяжести патологического процесса. В микробиоте носоглотки при инфекциях верхних отделов дыхательных путей доминируют *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus spp.* и *Streptococcus pneumoniae*; несколько реже выделяются дрожжеподобные грибы рода *Candida* и *Streptococcus pyogenes*. В изученной группе госпитализированных

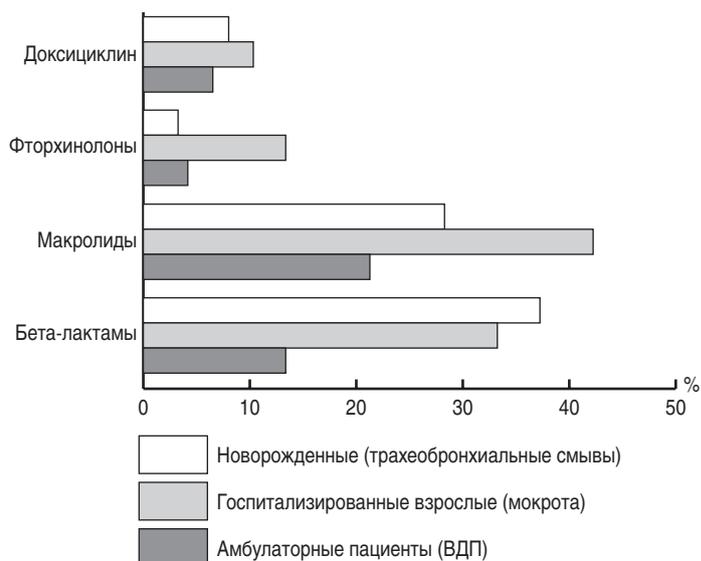


Рис. 5. Резистентность *Streptococcus pneumoniae* к антибактериальным препаратам.

пациентов с инфекциями нижнего отдела дыхательных путей на первом месте *Candida spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Klebsiella pneumoniae*. Взрослые пациенты отделения реанимации чаще всего инфицированы грамотрицательными микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae* и НФГОМ, у новорожденных же чаще всего в составе микробиоты встречались коагулазонегативные стафилококки, реже НФГОМ, энтеробактерии, дрожжеподобные грибы рода *Candida* и *Streptococcus pneumoniae*.

При существенных различиях микробиологической картины в изученных категориях пациентов во всех группах с различной частотой отмечается высеивание *Streptococcus pneumoniae*. При этом выделенные штаммы пневмококка оказались неоднородны по антибиотикорезистентности в изученных категориях пациентов. Наибольший уровень резистентности к β-лактамам антибиотикам выявлен у штаммов, колонизирующих дыхательные пути новорожденных отделения реанимации; к макролидам и фторхинолонам – у штаммов, выделенных из мокроты и трахеобронхиальных смывов взрослых госпитализированных пациентов.

Полученные результаты отражают локальные особенности микробного пейзажа при инфекциях дыхательных путей, дают материал для эпидемиологического анализа и определения стратегии эмпирической антимикробной терапии при различных формах инфекций дыхательных путей.

Литература

- Holzapfel L, Chevret S, Madinier G, Ohen F, Demingon G, Coupury A, Chaudet M. Influence of long-term oro- or nasotracheal intubation on nosocomial maxillary sinusitis and pneumonia: results of a prospective, randomized, clinical trial. Crit Care Med. 1993;21(8):1132-8.
- Murphy TF, Sethi S. Chronic obstructive pulmonary disease: role of bacteria and guide to antibacterial selection in the older patient. Drugs Aging. 2002;19(10):761-75.
- Чучалин АГ, Синкопальников АИ, Козлов РС, Тюрин ИЕ, Рачина СА. Внебольничная пневмония у взрослых. Практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. М.: Атмосфера, 2010, 106 с.

4. Чучалин АГ, Гельфанд БР. Нозокомиальная пневмония у взрослых (Национальные рекомендации). Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2009;11(2):100-42.
5. Craven DE, Kunches LM, Kilinsky V, Lichtenberg DA, Make BJ, McCabe WR. Risk factors for pneumonia and fatality in patients receiving continuous mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis.* 1986;133(5):792-6.
6. Алиева АИ, Касумова М, Абсерханова ДУ. Пневмонии новорожденных: особенности этиологии, диагностики и лечения. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014;16,5(4):1427-9.
7. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания. МУ 4.2.2039-05
8. Austrian R. Pneumococcus: the first one hundred years. *Rev Infect Dis.* 1981 Mar-Apr;3(2):183-9.
9. Melo-Cristino J, Santos L, Ramirez M; Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias. The Viriato Study: update of antimicrobial susceptibility data of bacterial pathogens from community-acquired respiratory tract infections in Portugal in 2003 and 2004. *Rev Port Pneumol.* 2006 Jan-Feb;12(1):9-30.
10. Morrissey I, Robbins M, Viljoen L, Brown DF. Antimicrobial susceptibility of community-acquired respiratory tract pathogens in the UK during 2002/3 determined locally and centrally by BSAC methods. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Feb;55(2):200-8. DOI: 10.1093/jac/dkh540
11. Inoue M, Lee NY, Hong SW, Lee K, Felmingham D. PROTEKT 1999-2000: a multicentre study of the antibiotic susceptibility of respiratory tract pathogens in Hong Kong, Japan and South Korea. *Int J Antimicrob Agents.* 2004 Jan;23(1): 44-51.
12. Liu YN, Chen MJ, Zhao TM, Wang H, Wang R, Liu QF, et al. A multicentre study on the pathogenic agents in 665 adult patients with community-acquired pneumonia in cities of China. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2006 Jan;29(1):3-8.
13. Inoue M, Kohno S, Kaku M, Yamaguchi K, Igari J, Yamanaka K. PROTEKT 1999-2000: a multicentre study of the antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens in Japan. *Int J Infect Dis.* 2005 Jan;9(1):27-36. DOI: 10.1016/j.ijid.2004.03.008

References

Информация об авторах:

Матущенко Елена Валериевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет»
 Адрес: 644007, Омск, ул. Герцена, 69
 Телефон: (3812) 65-0488

Калитина Ирина Ивановна, врач-бактериолог лаборатории клинической микробиологии БУЗОО «Городской клинический перинатальный центр»
 Адрес: 644007, Омск, ул. Герцена, 69
 Телефон: (3812) 23-6075

Абросимова Ольга Андреевна, врач-бактериолог лаборатории клинической микробиологии БУЗОО «Городской клинический перинатальный центр»
 Адрес: 644007, Омск, ул. Герцена, 69
 Телефон: (3812) 23-6075

Пядочкина Татьяна Вячеславовна, врач-бактериолог лаборатории клинической микробиологии БУЗОО «Городской клинический перинатальный центр»
 Адрес: 644007, Омск, ул. Герцена, 69
 Телефон: (3812) 23-6075

Матущенко Антон Ильич, студент 6 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет»
 Адрес: 644007, Омск, ул. Герцена, 69
 Телефон: (3812) 65-0488

Information about authors:

Elena V. Matushchenko, PhD (Med.), Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Omsk State Medical University
 Address: 69 Herzen str., Omsk, 644007, Russian Federation
 Phone: (3812) 65-0488

Irina I. Kalitina, bacteriologist of the Laboratory of Clinical Microbiology of the City Clinical Perinatal Center
 Address: 69 Herzen str., Omsk, 644007, Russian Federation
 Phone: (3812) 23-6075

Olga A. Abrosimova, bacteriologist of the Laboratory of Clinical Microbiology of the City Clinical Perinatal Center
 Address: 69 Herzen str., Omsk, 644007, Russian Federation
 Phone: (3812) 23-6075

Tatyana V. Padochkina, bacteriologist of the Laboratory of Clinical Microbiology of the City Clinical Perinatal Center
 Address: 69 Herzen str., Omsk, 644007, Russian Federation
 Phone: (3812) 23-6075

Anton I. Matushchenko, 6th year student, Medical Faculty of the Omsk State Medical University
 Address: 69 Herzen str., Omsk, 644007, Russian Federation
 Phone: (3812) 65-0488

Фунгицидная активность опытных образцов ниосомальных антигрибковых гелей

И.А.Базиков¹, А.Н.Мальцев¹, А.Е.Щекотихин², А.Н.Тевяшова³, В.В.Бинатова¹, М.А.Селимов¹

¹ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»,
Ставрополь, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И.Менделеева»,
Москва, Российская Федерация;

³ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе», Москва, Российская Федерация

Разработаны опытные образцы ниосомальных гелей с антифунгальными веществами. Изучена антифунгальная активность *in vitro* к грибам *Candida albicans*. Инкапсулирование антифунгальных веществ в модифицированные атомами серебра ниосомы увеличивает их противогрибковое действие. Изучение фармакокинетики ниосомальных форм антифунгальных веществ показало, что их концентрация в крови зависит от химических и биофизических свойств самих веществ и скорости взаимодействия ниосом с липидными фазами.

Ключевые слова: антифунгальные вещества, ниосомы, фунгицидная активность, фармакокинетика

Для цитирования: Базиков И.А., Мальцев А.Н., Щекотихин А.Е., Тевяшова А.Н., Бинатова В.В., Селимов М.А. Фунгицидная активность опытных образцов ниосомальных антигрибковых гелей. Бактериология. 2017; 2(3): 21–27. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-21-27

Fungicidal activity of experimental species of niosomal antifungal gels

I.A.Bazikov¹, A.N.Maltsev¹, A.E.Schekotikhin², A.N.Tevyashova³, V.V.Binatova¹, M.A.Selimov¹

¹Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation;

²D.Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation;

³Gause Institute of New Antibiotics (GINA), Moscow, Russian Federation

Experimental samples of niosomal gels with antifungal substances have been developed. Antifungal activity *in vitro* against *Candida albicans* has been studied. Encapsulation of antifungal substances in niosome modified by silver atoms increases their antifungal activity. The study of the pharmacokinetics of niosomal forms of antifungal substances has shown that their concentration in the blood depends on the chemical and biophysical properties of the substances themselves and the rate of interaction of niosomes with the lipid phases.

Keywords: antifungal substances, niosomes, fungicidal activity, pharmacokinetics

For citation: Bazikov I.A., Maltsev A.N., Schekotikhin A.E., Tevyashova A.N., Binatova V.V., Selimov M.A. Fungicidal activity of experimental species of niosomal antifungal gels. Bacteriology. 2017; 2(3): 21–27. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-21-27

В настоящее время одной из перспективных стратегий повышения эффективности действия лекарственных препаратов является создание их новых форм с применением методов микрокапсулирования. Ниосомы – это стабильные микроскопические везикулы, образованные одной или несколькими бислойными мембранами различного состава. Широкое применение неионных поверхностно-активных веществ и липидов в конструировании подобных систем обусловлено их биосовместимостью, способностью к биодегра-

дации, а также низкой токсичностью [1, 2]. Разработка антифунгальных ниосомальных гелей может позволить снизить токсические эффекты при их применении, уменьшить оптимальную дозу препарата, а также обеспечить пролонгированное действие лекарственной субстанции в составе ниосом [3]. Снижение проявлений системной токсичности при использовании ниосомальных форм связано в первую очередь с уменьшением пиковой концентрации действующего вещества в крови за счет медленного высвобождения ин-

Для корреспонденции:

Базиков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310

Телефон: (8652) 35-2475

E-mail: bazikov@list.ru

Статья поступила 07.08.2017 г., принята к печати 26.09.2017 г.

For correspondence:

Igor A. Bazikov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University

Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation

Phone: (8652) 35-2475

E-mail: bazikov@list.ru

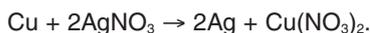
The article was received 07.08.2017, accepted for publication 26.09.2017

капсулята из ниосом вследствие диффузии через мембрану микровезикул и их деструкции под воздействием ферментов организма. Ранее нами сообщалось об оптимизации технологии получения и стабилизации новой анионной полиэтиленгликоль (ПЭГ)-содержащей ниосомальной формы доксорубина и оценке физико-химических свойств полученного ниосомального препарата [4, 5].

Целью нашего исследования явилось изучение физических свойств, фармакокинетики и антифунгального действия опытных образцов ниосомальных противогрибковых препаратов.

Материалы и методы

Получение ниосом и инкапсулирование в них противогрибковых препаратов проводилось по оригинальной технологии [5–11]. Для создания оболочки использовался ПЭГ-12 Диметикон. При конструировании антифунгального ниосомального геля отработывалась также технология серебрения ниосом. Для серебрения ниосом использовали 1М раствор AgNO_3 . Серебро восстанавливали в реакции по следующей формуле:



Для этого реакцию восстановления проводили в химически чистой медной посуде. После образования на стенках медной чашки белого налета остатки жидкости сливали и добавляли суспензию ниосом. Сорбция серебра на ниосомы проходила при ультразвуковой обработке реакционной смеси. Режим озвучивания: частота – 20 кГц, мощность – 200 Вт, экспозиция – 10–15 мин.

Пробоподготовку для изучения физических характеристик опытных образцов ниосомальных противогрибковых препаратов проводили следующим образом: предварительно подготовленные образцы (чистые ниосомы с инкапсулированными противогрибковыми препаратами) растворяли в этаноле, после чего перемешивали до полного растворения и наносили в виде нескольких капель на свежесколотую слюдяную пластину, после чего ее сушили при комнатной температуре в течение 1 ч.

В качестве антифунгальных веществ использовали три препарата: 1) амфотерицин В – противогрибковый антибиотик из группы полиенов, продуцируемый грибом *Streptomyces nodosus*; 2) итраконазол – производное вещества триазола, противогрибковое средство широкого спектра действия, активное в отношении дерматофитов, дрожжевых и плесневых грибов и 3) флуконазол (дифлюкам) – антифунгальный препарат 3-го поколения, производный триазола, активный против различных видов грибов, особенно при системных микозах.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ) проводился количественный анализ содержания в крови антифунгальных веществ при трансдермальном применении ниосомальных гелей с антимикотиками. Определение антифунгальных препаратов в сыворотке крови экспериментальных животных проводили следующим образом.

1) Для определения концентрации амфотерицина В к 200 мл сыворотки добавляли 800 мл смеси метанол/вода (2:1 v/v). Смесь вортиксировали 1 мин и центрифугировали 10 мин при 4500 об/мин. Супернатант фильтровали через

микрофильтр PVDF (размер пор 220 нм). Использовали колонку С18 150 × 2,1, подвижная фаза 0,01М ЭДТА в воде, рН 5,0 : ацетонитрил в пропорции 60 : 40, время выхода амфотерицина В составило $5,40 \pm 0,05$ мин.

2) При определении содержания итраконазола 400 мкл сыворотки смешивали с 40 мкл водного раствора ZnSO_4 (20% w/v) (для осаждения белков) и 400 мкл ацетонитрила. Смесь вортиксировали 10 сек и центрифугировали при 9300 г в течение 5 мин. Супернатант фильтровали через микрофильтр PVDF (размер пор 220 нм). Использовали колонку С18 150 × 2,1, подвижная фаза 0,2% триэтиламин в воде, рН 3,0 фосфорная кислота: ацетонитрил в пропорции 40 : 60, время выхода итраконазола составило 6,751 мин.

3) Для определения концентрации флуконазола к 200 мкл сыворотки добавляли 5 мкл изопропилового спирта, смесь вортиксировали. К раствору добавляли 20 мкл 0,1 М NaOH, смесь вортиксировали. В последующем добавляли 1 мл дихлорметана, водный слой удаляли, органический упаривали в токе аргона, остаток растворяли в 1000 мкл подвижной фазы (ацетонитрил: вода 22 : 78 по объему) и фильтровали через микрофильтр PVDF (размер пор 220 нм). Использовали колонку С18 150 × 2,1, подвижная фаза вода: ацетонитрил в пропорции 78 : 22, время выхода флуконазола составило 3,347 мин.

Исследование антифунгальной активности ниосомального геля с антибактериальными препаратами осуществляли диско-диффузионным методом (ДДМ) при изучении чувствительности к ним *Candida albicans*. Предварительно пропитывали бумажные диски ниосомальным гелем с антифунгальными препаратами. Затем их наносили на агаровую чашку Петри с грибами, предварительно подрощенными сплошным поверхностным слоем. Испытание с каждой культурой производили параллельно на трех чашках. Засеянные чашки оставляли при комнатной температуре на 1–2 ч, а затем на 16–18 ч помещали в термостат при $36 \pm 1^\circ\text{C}$ вверх дном, чтобы избежать попадания конденсата на поверхность посевов. Ниосомальный гель диффундировал в агар, формируя вокруг диска зону лизиса (угнетения роста) чувствительных к нему грибов *Candida albicans*, четко выделяющуюся на фоне сплошного роста грибов. Величина зоны лизиса определяла степень чувствительности *Candida albicans* к исследуемому препарату. Размер зон лизиса производили с помощью миллиметровой бумаги с точностью до 0,1 мм. Степень чувствительности *Candida albicans* к препаратам в зависимости от диаметра зоны лизиса определяли следующим образом: менее 10 мм – слабая чувствительность; 10 мм – умеренная чувствительность; более 10 мм – высокая чувствительность. Исследовали антифунгальную активность четырех доз каждого вещества в концентрации 5, 10, 15 и 20% активного вещества в ниосомальном геле.

Величины диаметров зон задержки роста микроорганизмов обрабатывались общепринятыми статистическими методами: рассчитывали значения средней арифметической (\bar{X}) и стандартного отклонения среднего (S_x). При оценке достоверности различий между сравниваемыми величинами применялся непараметрический критерий Манна-Уитни. Уровень достоверности различий принимался при $p \leq 0,05$.

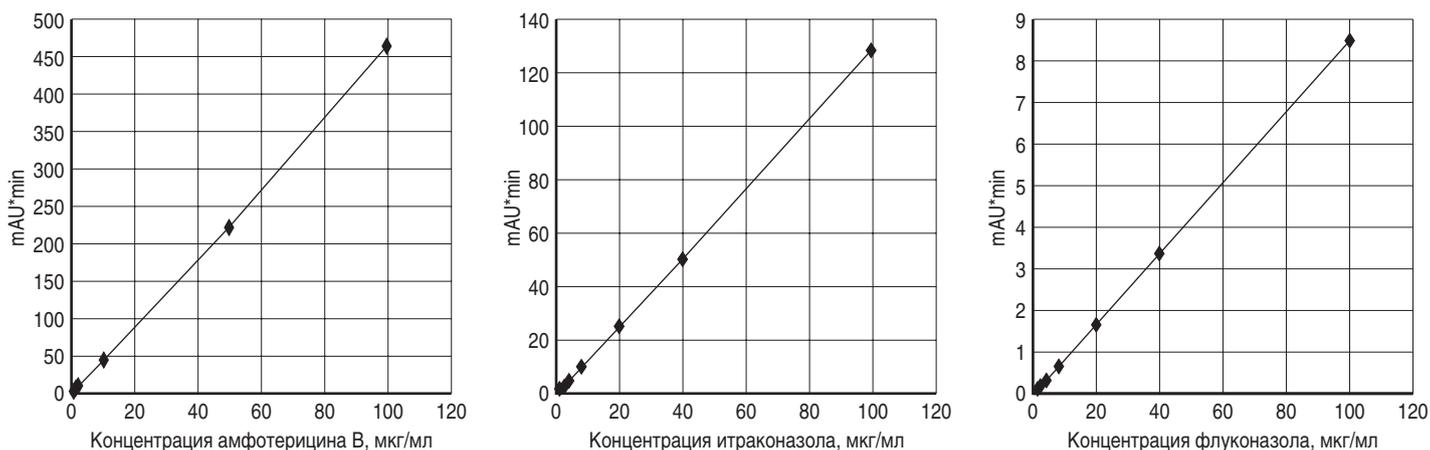


Рис. 1. Калибровочные кривые антифунгальных ниосомальных препаратов.

Результаты и обсуждение

Электронная микроскопия кремнийорганических ниосом позволила установить, что ниосомы – это нановезикулы размером 80–140 нм, состоящие из оболочки в виде нерастворимого в воде двойного слоя неионогенного эмульгатора (ПАВ), представленного группой веществ – диметикон кополиолов (эфир полиэтиленгликоля и полидиметилсилоксановой основы), заключенного внутри капсулы активной фармацевтической субстанции. Толщина стенок ниосомы составила 3,33 нм. Диаметр резервуара для антифунгальных веществ составил до 12 нм (рис. 2). Молекулы полидиметилсилоксановой основы стенок везикул обладали эластичностью, что позволяет направленно высвобождать из нановезикул широкий спектр активных субстанций.

Это мы связываем с наличием функционально активных групп в молекуле 12 диметикона. Ковалентные связи Si-O-Si в гидрофобной части молекулы полидиметилсилоксановой основы обладают большой эластичностью и реакционной способностью, что позволяет осаждать атомы серебра на поверхности ниосом. Диметикон кополиолы представляют

собой гибрид кремния (диметикона) и углерода (полиэтиленгликоля). CH_3 – метильные группы образуют «облако» вокруг атомов Si, что обеспечивает стабильность ниосом. Длина связи Si-O длиннее связи C-C, поэтому молекула ПЭГ – 12 диметикона эластичнее фосфолипидов, используемых при формировании везикул (липосом), и способна образовывать везикулы без значительных энергетических усилий. Длина связи Si-O 1,6 Å (длина связи аналогов ПАВ C-C 1,4 Å), угол связи Si-O-Si составляет 130 градусов, в отличие от 109 градусов связи C-C-C. Связь Si-O-Si вращается и поэтому также обладает большой эластичностью.

Высвобождение антифунгальных веществ происходит постепенно при попадании их в липидную или фосфолипидную среду. Методом ВЖХ проведен количественный анализ содержания в крови антифунгальных веществ, при трансдермальном применении ниосомальных гелей с антимикотиками. Так, изучение фармакокинетики ниосомальных форм антифунгальных веществ показало, что концентрация в крови зависит от химических и биофизических свойств самих веществ и скорости взаимодействия ниосом с липидными фазами (табл. 1, рис. 3).

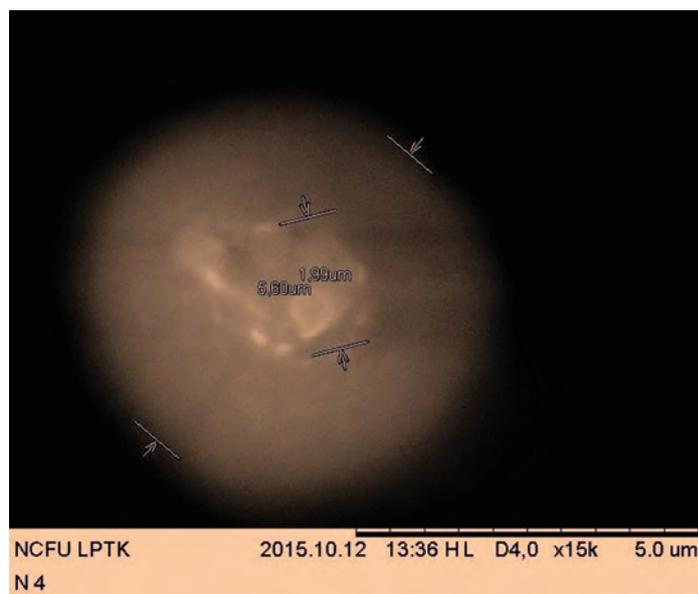
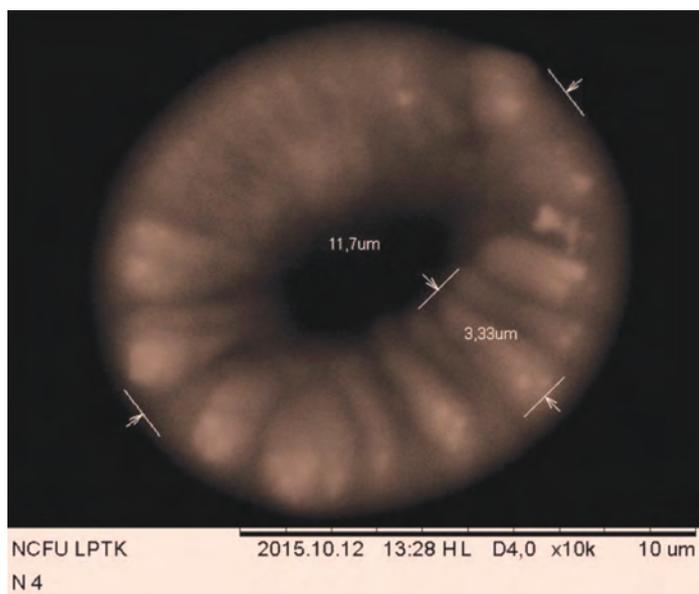


Рис. 2. Электронная микроскопия кремнийорганической ниосомы с включенным в нее амфотерицином.

Таблица 1. Содержание антифунгальных веществ в сыворотке крови экспериментальных животных

Время после нанесения препаратов, ч	Среднее значение AUC	Концентрация, мкг/мл
АмфВ-1		
6	0	–
24	0	–
30	0	–
48	0	–
54	0,206	0,04569
Итрак-2		
6	0,0252	0,01932
24	0,4284	0,32851
30	3,6759	3,56742
48	3,0361	2,32818
54	3,2067	2,45900
Флук-3		
6	0,0490	0,49696
24	0,0498	0,50507
30	0,0476	0,48280
48	0,0468	0,47465
54	0,0563	0,57099

Так, амфотерицин – препарат, относящийся к антибиотикам, хорошо растворим в воде и плохо растворим в липидах и органических растворителях. При трансдермальном его введении в крови появляется на 3-и сутки (табл. 1). Следовательно, ниосомальную форму препарата хорошо использовать для наружного применения. Этим мы предотвращаем негативное воздействие антибиотика на внутренние органы.

Трансдермальное введение ниосомального геля итраконазола обеспечивает максимальную концентрацию препарата в крови через 30 ч после его нанесения на поверхность кожи экспериментальных животных. Следует отметить, что при трансдермальном введении итраконазола высокий уровень его концентрации в крови отмечается на 48-й и 54-й часы после нанесения ниосомальной формы противогрибкового вещества на кожу (табл. 1). Это свидетельствует о том, что при трансдермальном введении инкапсулированного в ниосомы итраконазола снижается частота его введения и, следовательно, количество вещества на курс лечения. Данная методика введения итраконазола позволит снизить затраты на лечение больного, а самое главное, побочные эффекты, в частности негативное влияние препарата на органы пищеварения.

При трансдермальном введении флуконазола его высокая концентрация в крови достигается уже через 6 ч после нанесения препарата на кожу и сохраняется в течение 3 сут. Концентрация флуконазола в крови при этом остается на высоком уровне в течение 54 ч после нанесения на кожу (табл. 1). Это, на наш взгляд, связано со снижением его метаболизации в печени, что также позволяет снижать количество препарата на курс лечения.

Таким образом, инкапсулирование антифунгальных препаратов в ниосомы позволяет снизить побочные эффекты

данных веществ, которые возникают при их введении другими способами. Помимо этого, зная фармакокинетику ниосомальных форм антифунгальных веществ, мы можем регулировать высвобождение и поддержание терапевтических доз препарата в различных областях организма.

Изучение антифунгальной активности ниосомального геля с противогрибковыми веществами показало, что препарат подавляет рост грибов. Так, в отношении *Candida albicans* зона задержки роста для ниосом с антифунгальным веществом амфотерицином в концентрации 5% составила $20,3 \pm 0,11$ мм. В концентрации 10% зона задержки роста составила $13,7 \pm 0,12$ мм. При содержании амфотерицина в ниосомальном геле в концентрации 15% зона задержки роста *Candida albicans* составила $28,8 \pm 0,14$ мм. Зона задержки роста составила для 20% опытного образца ниосомального геля $35,1 \pm 0,16$ мм. Согласно литературным данным, амфотерицин, в зависимости от концентрации, обладает фунгицидной или фунгистатической активностью. Механизм действия препарата включает в себя связывание с клеточными мембранами грибковых стеролов и изменение их проницаемости. Препарат проявляет большую аффинность к эргостеролу, компоненту клеточных мембран грибов, по сравнению с холестеролом, компонентом клеток млекопитающих, однако это не исключает возникновения побочных эффектов, связанных с аффинностью к холестеролу. Известно, что препарат активен по отношению к *Candida spp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Sporotrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Rhodotorula spp.*, *Mucor mucedo*, *Histoplasma capsulatum*, *Leishmania infantum*. Липосомальная форма амфотерицина быстро поглощается печенью, откуда амфотерицин постепенно высвобождается и транспортируется в почки [12]. Инкапсулирование амфотерицина в кремнийорганические ниосомы позволит снизить его метаболизацию в печени и продлить терапевтическое действие.

Антифунгальная активность ниосом с итраконазолом для концентрации 5% проявлялась в зоне подавления роста диаметром $18,7 \pm 0,05$ мм (табл. 1, рис. 4). Для 10% препарата этот показатель был $25,2 \pm 0,11$ мм. Зона задержки роста *Candida albicans* 15% ниосомального геля итраконазола составляла $37,6 \pm 0,28$ мм и для 20% опытного образца препарата зона задержки роста составила $43,1 \pm 0,17$ мм. Согласно инструкции по применению данного препарата, механизм действия итраконазола связан с ингибированием синтеза эргостерола – важного компонента клеточной мембраны грибов. Препарат используется для лечения микозов, вызванных дерматофитами, дрожжами, аспергиллами и др. При применении итраконазола наблюдается целый ряд побочных эффектов. Так, возможна гепатотоксичность, в том числе острая печеночная недостаточность. Для снижения

Таблица 2. Исследование чувствительности *Candida albicans* диско-диффузионным методом к опытным образцам ниосомального геля с антифунгальными веществами

Ниосомальные препараты	Диаметр зоны задержки роста микроорганизма, мм ($D \pm d$) [*]			
	5%	10%	15%	20%
С инкапсулированным амфотерицином	$20,3 \pm 0,11^*$	$23,7 \pm 0,12^*$	$28,8 \pm 0,14^*$	$35,1 \pm 0,16^*$
С инкапсулированным итраконазолом	$18,7 \pm 0,05^*$	$25,2 \pm 0,11^*$	$37,6 \pm 0,28^*$	$43,1 \pm 0,17^*$
С инкапсулированным флуконазолом	$8,3 \pm 0,02^*$	$16,6 \pm 0,08^*$	$22,9 \pm 0,21^*$	$38,7 \pm 0,29^*$

^{*} $p < 0,05$ – в сравнении с контрольной группой.

токсических эффектов препарата нами предлагается инкапсулирование его в ниосомы, что позволяет снижать его терапевтические дозы и режимы введения.

Зоны задержки роста *Candida albicans* составили $8,3 \pm 0,02$ мм для 5% образца опытного препарата флуконазола, $16,6 \pm 0,08$ мм – для 10% ниосомального геля, $22,9 \pm 0,21$ мм – для 15% опытного образца и $38,7 \pm 0,29$ мм – для 20% образца опытного ниосомального препарата флуконазола (табл. 1, рис. 4). Согласно инструкции по применению, при его приеме внутрь биодоступность препарата составляет 90%. Препарат лишь на 12% связан с белками, хорошо распределяется в органах и тканях: мокроте, моче, слюне, влагалище, цереброспинальной жидкости. До 70% препарата проникает через гематоэнцефалический барьер и накапливается в тканях мозга. Время полувыведения флуконазола равно 30 ч. До 80% препарата в неизменен-

ном виде экскретируется почками. Инкапсулирование флуконазола в кремнийорганические ниосомы позволит удлинить время полувыведения и негативное воздействие на почки.

Таким образом, нами установлено, что опытные образцы разработанных ниосомальных гелей с антифунгальными веществами обладали высокой антифунгальной активностью *in vitro*. Повышение дозы содержания антифунгального вещества в ниосомах выше 15% практически не сказывается на их антифунгальной активности. Инкапсулирование антифунгальных веществ в модифицированные атомами серебра ниосомы увеличивает их противогрибковое действие в результате взаимодействия электростатических сил, возникающих между обладающей отрицательным зарядом клеточной мембраной микроорганизмов и положительно заряженным поверхностным слоем ниосом при ад-

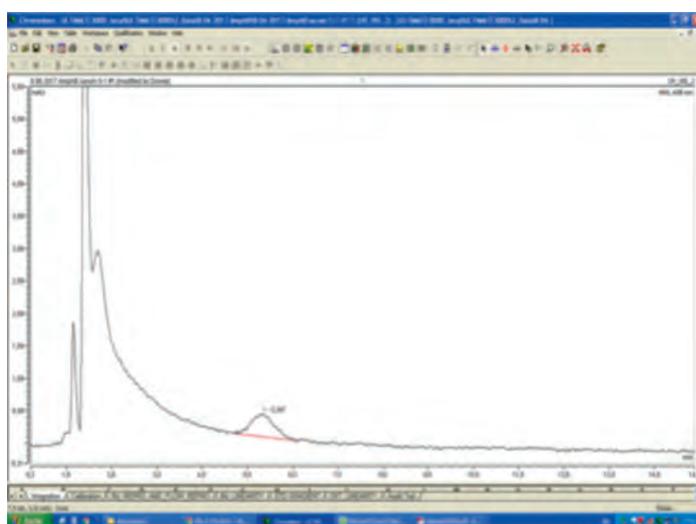
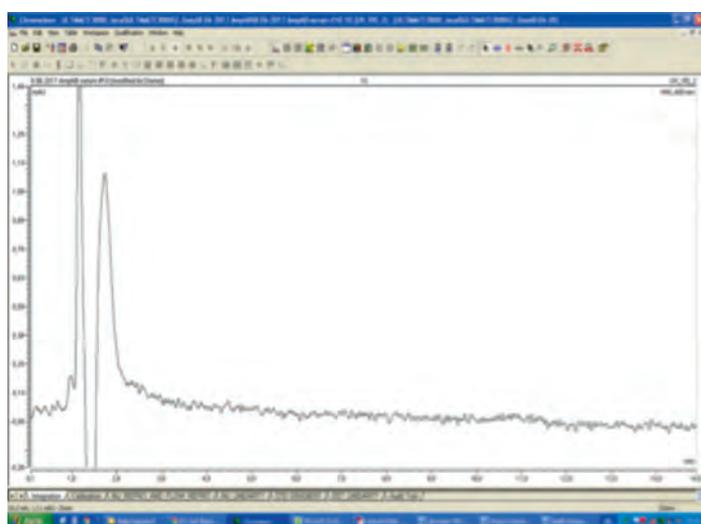


Рис. 3. Графики определения концентрации антифунгальных веществ в сыворотке крови.

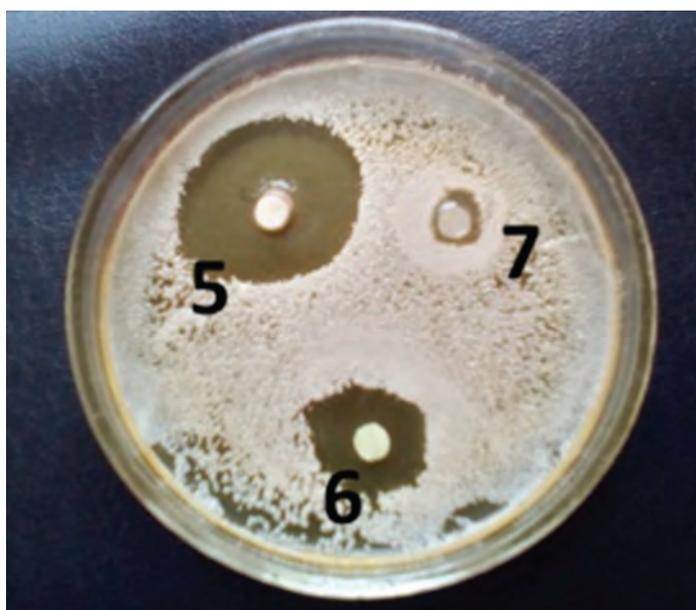


Рис. 4. Зоны задержки роста *Candida albicans* вокруг диска, пропитанного опытными образцами ниосомального геля с антифунгальными веществами. 1 – флуконазол 5 мг/мл (чистые ниосомы), 2 – итраконазол 5 мг/мл (чистые ниосомы) 3 – итраконазол 10 мг/мл (чистые ниосомы), 4 – итраконазол 5 мг/мл (Ag – ниосомы), 5 – амфотерицин 10 мг/мл, 6 – итраконазол 10 мг/мл (Ag – ниосомы), 7 – флуконазол 10 мг/мл (чистые ниосомы).

сорбции серебра на функциональные группы Si–O–Si диметикона. Кроме того, это может связано с ингибирующим воздействием серебра на ферменты дыхания микроорганизмов [13]. Согласно литературным данным, встраиваясь в реакционный центр ферментов, серебро изменяет функциональную активность пептидогликанов. Атомы серебра способны инактивировать некоторые ферменты микроорганизмов посредством связывания с тиольными группами с формированием сульфидов серебра. Атомы серебра также реагируют с амино-, карбокси-, фосфатно- и имидазольными группами ферментов, ингибируя активности глюкозооксидазы, В-галактозидазы, лактат-дегидрогеназы и глутатион-пероксидазы, что приводит к нарушению метаболизма микроорганизмов [13]. Имеются также данные, свидетельствующие об образовании комплексов нуклеиновых кислот с серебром и другими тяжелыми металлами, в том числе с золотом, вследствие чего нарушаются пространственная структура ДНК и, как следствие этого, способность бактерий к делению [13]. Взаимодействие атомов серебра с клеткой носит комплексный многофакторный характер и не ограничивается лишь одним из перечисленных выше механизмов, что увеличивает спектр для использования модифицированных кремнийорганических ниосом. Инкапсулирование антифунгальных веществ как в чистые ниосомы, так и в модифицированные атомами серебра кремнийорганические ниосомы снижает их терапевтические дозы и повышает антифунгальную активность, что приведет к существенному снижению затрат на лечение и, главное, снизит побочные эффекты данных веществ на здоровые органы и ткани.

Литература

1. Базиков ИА, Бейер ЭВ, Лукинова ВВ, Мальцев АН. Сравнительная оценка острой токсичности доксорубина и его ниосомальной формы. Медицинский Вестник Северного Кавказа. 2015;10(4):403-6. DOI: 10.14300/mnnc.2015.10098
2. Базиков ИА, Лукинова ВВ, Мальцев АН, Айтекова СР, Дискаева ЕИ. Взаимодействие ниосомального доксорубина с мембранам клеток. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;1(11):108-10. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11011
3. Базиков АИ, Мальцев АН, Селимов НА, Читанова АД. Физическое характеристики опытного образца антифунгального ниосомального геля с итраконазолом. Проблемы медицинской микологии. 2016;18(2):41.
4. Базиков ИА, Лукинова ВВ, Малинина НИ, Мальцев АН. Изучение механизмов межклеточного взаимодействия ниосомальной формы противоопухолевого препарата доксорубина с плазматическими мембранами. Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). 2016;3(24):34-5.
5. Базиков ИА, Селимов МА, Лукинова ВВ, Малинина НИ. Серебрение разработанных кремнийорганических наноконтейнеров (ниосом) для адресной доставки лекарственных средств. Евразийский Союз Ученых. 2016;3(24):36.
6. Базиков ИА, Лукинова ВВ, Малинина НИ, Мальцев АН. Антимикробная активность модифицированных атомами серебра кремнийорганических ниосом. Евразийский Союз Ученых. 2016;3(24):38.
7. Базиков ИА, Лукинова ВВ, Малинина НИ, Мальцев АН. Патоморфологические изменения роговицы при использовании офтальмологического ниосомального геля «Регенерин» в эксперименте. Евразийский Союз Ученых. 2016;3(24):40.

8. Мальцев АН, Базиков ИА, Малинина НИ. Модификация кремнийорганических ниосом атомами серебра для придания им антимикробной активности. Медицинская профилактика, реабилитация и курортная медицина на рубеже III-го тысячелетия: сборник статей международной научно-практической конференции. Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2016, 308 с.
9. Базиков ИА, Аксенов АВ, Мальцев АН, Селимов МА, Корниенко АВ, Аксенов АН, и др. Свойства разработанной ниосомальной формы противоопухолевого вещества N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-Indol-3-yl)-2-phenylacetamide для лечения глиобластомы. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;11(2):196-9. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11035
10. Базиков ИА, Бейер ЭВ, Мальцев АН, Гоптарева ЕА, Малинина НИ, Селимов МА, Боташева ВС. Исследование кардиотоксичности ниосомальной формы доксорубина. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;11(3):421-5. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11093
11. Базиков ИА, Бейер ЭВ, Мальцев АН, Гоптарева ЕА, Малинина НИ, Боташева ВС, Королькова ВИ. Изучение гепатотоксичности ниосомальной формы доксорубина. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;11(4):525-29. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11124
12. Блажитко ЕМ, Бурмистров ВА, Колесников АП, и др. Серебро в медицине. Новосибирск: Наука-Центр, 2004, 254 с.
13. Lysenkova LN, Godovikov IA, Korolev AM, Danilenko VN, Bekker OB, Mavletova DA, et al. Preobrazhenskaya Synthesis and anti-actinomycotic activity of the thiocyanato derivative of oligomycin A modified in the 2-hydroxypropyl side chain. Macroheterocycles. European Journal of Medicinal Chemistry. 2011;46:423-8.

Reference

1. Bazikov IN, Beyer EV, Lukinova VV, Maltsev AN. Comparative evaluation of acute toxicity doxorubicin and its in niosomes. Medical news of the North Caucasus. 2015;10(4):403-6. DOI: 10.14300/mnnc.2015.10098 (In Russian).
2. Bazikov IA, Lukinova VV, Mal'tsev AN, Aitekova SR, Diskaeva EI. Interaction niosomal doxorubicin cell membranes. Medical news of the North Caucasus. 2016;1(11):108-10. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11011 (In Russian).
3. Bazikov IA, Maltsev AN, Selimov MA, Chitanava AD. Physical characteristics of the prototype niosomal antifungal gel with itraconazole. Problems in Medical Mycology. 2016;18(2):41. (In Russian).
4. Bazikov IA, Lukinova VV, Malinina NI, Mal'tsev AN. Izuchenie mekhanizmov mezhkletochnoho vzaimodeistviya niosomal'noi formy protivopukholevogo preparata doksorubitsina s plazmaticheskimi membranami. Eurasian Union of Scientists (EUS). 2016;3(24):34-5. (In Russian).
5. Bazikov IA, Selimov MA, Lukinova VV, Malinina NI. Serebrenie razrabotannykh kremniorganicheskikh nanokonteinerov (niosom) dlya adresnoi dostavki lekarstvennykh sredstv. Eurasian Union of Scientists (EUS). 2016;3(24):36. (In Russian).
6. Bazikov IA, Lukinova VV, Malinina NI, Mal'tsev AN. Antimikrobnaya aktivnost' modifitsirovannykh atomami serebra kremniorganicheskikh niosom. Eurasian Union of Scientists (EUS). 2016;3(24):38. (In Russian).
7. Bazikov IA, Lukinova VV, Malinina NI, Mal'tsev AN. Patomorfologicheskie izmeneniya rogovitsy pri ispol'zovanii oftal'mologicheskogo niosomal'nogo gelya «Regenerin» v eksperimente. Eurasian Union of Scientists (EUS). 2016;3(24):40. (In Russian).
8. Mal'tsev AN, Bazikov IA, Malinina NI. Modifikatsiya kremniorganicheskikh niosom atomami serebra dlya pridaniya im antimikrobnai aktivnosti [Modification of silicone nios atoms of silver to make them antimicrobial activity]. Medical prevention and rehabilitation: Proceedings of International Scientific-Practical Conference. Stavropol, 2016, 308 p. (In Russian).
9. Bazikov IA, Aksenov AV, Mal'tsev AN, Selimov MA, Kornienko AV, Aksenov AN, et al. Properties of developed niosomal forms of anticancer substances N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-Indol-3-yl)-2-phenylacetamide in treatment of gli-

- blastoma. Medical news of the North Caucasus. 2016;11(2):196-9. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11035 (In Russian).
10. Bazikov IA, Beer EV, Maltsev AN, Goptareva EA, Malinina NI, Selimov MA, Botasheva VS. Study cardiotoxicity niosomal forms of doxorubicin. Medical news of the North Caucasus. 2016;11(3): 421-5. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11093 (In Russian).
11. Bazikov IA, Beyer EV, Maltsev AN, Goptareva EA, Malinina NI, Botasheva VS, Korolkova VI. Study of hepatotoxicity of niosomal form of doxorubicin. Medical news of the North Caucasus. 2016;11(4):525-29. (In Russian). DOI: 10.14300/mnnc.2016.11124
12. Blagitko EM, Burmistrov VA, Kolesnikov AP, et al. Serebro v meditsine [Silver in medicine]. Novosibirsk: "Nauka-Tsentr" Publ., 2004, 254 p. (In Russian).
13. Lysenkova LN, Godovikov IA, Korolev AM, Danilenko VN, Bekker OB, Mavletova DA, et al. Preobrazhenskaya Synthesis and anti-actinomycotic activity of the thiocyanato derivative of oligomycin A modified in the 2-hydroxypropyl side chain. Macroheterocycles. European Journal of Medicinal Chemistry. 2011;46:423-8.

Информация о авторах:

Мальцев Александр Николаевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биологически активных веществ ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»
Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира 310
Телефон: (8652)352475
E-mail: Maltsev7@rambler.ru

Щекотихин Андрей Егорович, доктор химических наук, профессор РАН, заведующий кафедрой органической химии Российского химико-технологического университета им. Д.И.Менделеева
Адрес: 119021, Москва, ул. Б.Пироговская, 11
Телефон: (499)246-0228
E-mail: shchekotihin@mail.ru

Тевяшова Анна Николаевна, доктор химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химической трансформации антибиотиков НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе
Адрес: 119021, Москва, ул. Б.Пироговская, 11
Телефон: (499) 245-3753
E-mail: chulisenator@gmail.com

Бинатова Виктория Васильевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»
Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира 310
Телефон: (8652) 35-2475

Селимов Магомед Асланович, кандидат технических наук, ассистент кафедры биотехнологии и клинической биохимии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»
Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира 310
Телефон: (8652) 35-2475
E-mail: selimovma@mail.ru

Information about the authors:

Alexander N. Maltsev, Cand. Sc. (Biology), Head of the Laboratory of Biologically Active Substances, Stavropol State Medical University
Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 35-2475
E-mail: Maltsev7@rambler.ru

Andrei E. Schekotikhin, Doctor of Chemical Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Organic Chemistry D.Mendeleev University of Chemical Technology of Russia
Address: 11 B. Pirogovskaya, Moscow, 119021, Russian Federation
Phone: (499) 246-0228
E-mail: shchekotihin@mail.ru

Anna N. Tevyashova, Doctor of Chemistry, Senior Research Associate, Laboratory of Chemical Transformation of Antibiotics, Institute of New Antibiotics (GINA)
Address: 11 B. Pirogovskaya, Moscow, 119021, Russian Federation
Phone: (499) 245-3753
E-mail: chulisenator@gmail.com

Viktoria V. Binatova, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University
Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 35-2475

Magomed A. Selimov, Candidate of Technical Sciences, Assistant of the Department of Biotechnology and Clinical Biochemistry, Stavropol State Medical University
Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 35-2475
E-mail: selimovma@mail.ru

Ученые раскрыли тайну распространения генов устойчивости

Выявление источника возникновения генов устойчивости к антибиотикам и способов их распространения сравнивают с поиском нулевого пациента при вспышке заболевания. Гипотеза о происхождении генов устойчивости от микроорганизмов, продуцирующих антибиотики, высказанная около 30 лет назад, все еще не получила прямого доказательства этой передачи.

Исследования, выполненные в Центре биологической устойчивости Novo Nordisk – DTU Biosustain (Технологический университет Дании), впервые показали, что гены устойчивости к антибиотикам происходят из того же места, что и антибиотические соединения, т.е. из группы почвенных бактерий *Actinobacteria*, продуцирующих более ¾ современных антибиотиков и одновременно несущих гены антибиотикоустойчивости.

Изучив последовательность ДНК вокруг генов устойчивости, ученые выяснили, что перенос генов устойчивости осуществляется простым половым процессом с актинобактерией после чего она гибнет.

Этот перенос гена путем переноса назад может в принципе происходить, когда патогены вступают в контакт с актинобактериями, например, на животноводческой ферме или в почве, загрязненной необработанными больничными отходами. Таким образом, патоген может стать устойчивым и подвергнуть опасности жизни человека в процессе инфекции.

Механизм передачи осуществляется следующим образом.

1. Грамотрицательный патоген вводит свою ДНК в актинобактерии посредством конъюгации.
2. Внутри актинобактерий инъецированная ДНК рекомбинирует ДНК-хозяина, содержащую резистентные гены. После того, как *Actinobacterium* умирает, рекомбинантная ДНК высвобождается в окружающую среду.
3. Наконец, инъецированная ДНК может действовать как «склеивающая ДНК» и опосредовать поглощение гена устойчивости обратно патогенам путем естественной трансформации.

Scientists solve 30-year old mystery on how resistance genes spread.

EurekaAlert! Science News [Electronic resource].

URL: https://www.eurekaalert.org/pub_releases/2017-06/tuod-ss3061617.php (accessed: 05.07.2017).

Анализ белковых препаратов вирулентных штаммов *Y. pestis* методом двумерного электрофореза

П.Х.Копылов, Е.А.Красильникова, О.Н.Перовская, Р.З.Шайхутдинова,
С.А.Иванов, Е.А.Тюрин, А.П.Анисимов, С.В.Дентовская

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболенск, Российская Федерация

Клеточные суспензии вирулентных штаммов чумного микроба использовали для получения проб для двумерного электрофореза. Показано, что последовательная обработка микробных клеток водными растворами, включающими 80% трихлоруксусную кислоту и 90% ацетон, приводила к их полной инактивации. Специфическую стерильность доказывали высевы препаратов на чувствительные среды и постановками биопроб на мышах. 2D-электрофореграммы демонстрировали высокую степень разделения белков. Двумерный электрофез и масс-спектрометрия показали ожидаемое наличие F1 антигена (Caf1) и Ymt (мышинный токсин, фосфолипаза D) в препарате штамма *Y. pestis* И-3189 (pFra+).

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, протеом, двумерный гель-электрофорез, вирулентность, инактивация микробных клеток

Для цитирования: Копылов П.Х., Красильникова Е.А., Перовская О.Н., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Тюрин Е.А., Анисимов А.П., Дентовская С.В. Анализ белковых препаратов вирулентных штаммов *Y. pestis* методом двумерного электрофореза. Бактериология. 2017; 2(3): 28–32. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-28-32

Analysis of *Y. pestis* virulent strain proteins by two-dimensional electrophoresis

P.Kh.Kopylov, Ye.A.Krasil'nikova, O.N.Perovskaya, R.Z.Shaykhutdinova,
S.A.Ivanov, Ye.A.Tyurin, A.P.Anisimov, S.V.Dentovskaya

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation

Y. pestis microbial cell suspensions have been used for preparation of samples for 2D-electrophoresis. It was demonstrated that consecutive treatment of microbial cells by water solutions of trichloroacetic acid (80%) and acetone (90%) yields to complete inactivation of samples. The specific sterility of preparations was demonstrated by seeding preparations on nutrient media and infection of mice. A high resolution of proteins of this preparation was revealed by 2D-electrophoresis. The expected presence of Caf1 and Ymt proteins in pFra⁺ plasmid bearing strain I-3189 was manifested by 2D-electrophoresis and mass spectrometry.

Keywords: *Yersinia pestis*, proteome, 2-D gel electrophoresis, virulence, microbial cell inactivation

For citation: Kopylov P.Kh., Krasil'nikova Ye.A., Perovskaya O.N., Shaykhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Tyurin Ye.A., Anisimov A.P., Dentovskaya S.V. Analysis of *Y. pestis* virulent strain proteins by two-dimensional electrophoresis. Bacteriology. 2017; 2(3): 28–32. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-28-32

Высокоразрешающий двумерный электрофорез лежит в основе протеомных технологий, позволяющих идентифицировать и охарактеризовать белки микроорганизмов. Воспроизводимость результатов протеомного анализа обуславливается высоким разрешением двумерных гелей и

зависит от градиента pH и качества исследуемого образца, содержащего репрезентативный пул белков в растворенном виде [1]. Для получения таких образцов используют традиционные реагенты, осаждающие белки, например, трихлоруксусную кислоту, аммоний серноокислый. Однако соосажде-

Для корреспонденции:

Копылов Павел Христофорович, кандидат биологических наук, заведующий сектором биохимии особо опасных инфекций, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: pkopylov@obolensk.org

Статья поступила 04.08.2017 г., принята к печати 26.09.2017 г.

For correspondence:

Pavel Kh. Kopylov, PhD (Biol.), head of the biochemistry of especially dangerous infections department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: pkopylov@obolensk.org

The article was received 04.08.2017, accepted for publication 26.09.2017

ние липополисахаридных и липидных компонентов цельноклеточных лизатов микроорганизмов существенно ухудшает разделение белков как по изоэлектрическим точкам, так и по молекулярным массам. Последовательная обработка тотальных клеточных осадков органическими растворителями позволяет значительно уменьшить количество нежелательных примесей [2]. Использование концентрированных растворов трихлоруксусной кислоты и органических растворителей позволяет добиться полноты осаждения белков и полностью инактивировать микробные клетки, что важно при работе с возбудителями опасных инфекций. В представленной публикации описаны эксперименты по определению инактивирующего действия химических реагентов, используемых при получении белковых препаратов из вирулентных штаммов *Y. pestis*, и приведены данные по получению и контролю безопасных образцов, пригодных для дальнейшего масс-спектрометрического анализа после разделения путем двумерного электрофореза.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовали два вирулентных штамма *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica* И-2422 (pFra⁻pCad⁺pPst⁺Pgm⁺) и И-3189 (pFra⁺pCad⁺pPst⁺Pgm⁺) из фондов ГКПМ-Оболensk.

Культивирование. Штаммы *Y. pestis* выращивали и пробоподготовку проводили в боксах биологической безопасности III класса, оборудованных в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами [3] и требованиями инструкций биологической безопасности в помещениях, относящихся по международной классификации к BSL3. Бактерии культивировали на плотной питательной среде Хоттингера с добавлением 5% гемолизированной крови в течение 2-х сут: 1-е сутки при температуре 28°C, 2-е – при температуре 37°C.

Получение препаратов для двумерного электрофореза. Полную петлю (10 мкл) каждого из исследуемых штаммов суспендировали в 1 мл фосфатного буферного раствора, содержащего 150 мМ NaCl, pH 7,2 (ФБР) в микропробирке объемом 2 мл. К полученной суспензии добавляли 250 мкл 80% раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивали с помощью пипетки и инкубировали в течение 30 мин на льду. Суспензии центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 × g и пипеткой удаляли надосадочную часть. К осадку добавляли 1 мл ледяного 90% водного раствора ацетона, ресуспендировали и центрифугировали при тех же условиях. Процедуру экстракции ацетоном повторяли дважды, после чего из каждого образца отбирали пробу объемом 20 мкл для проверки специфической стерильности.

Определение специфической стерильности. Для исключения бактериостатического действия ацетона пробы объединяли (не более 5 проб), после чего разводили 5 мл ФБР для последующего высева на чувствительные среды и постановки биопробы на мышах. По 0,2 мл подготовленных разбавленных проб высевали в пяти повторах на агар Хоттингера с 2% гемолизированной кровью, а также, в пяти повторах в пробирки с полужидкой тиогликолевой средой. Посевы инкубировали в течение 7 сут в термостате при температуре 28°C, оптимальной для роста *Y. pestis*. Параллельно

проводили контроль ростовых качеств и контроль стерильности используемых сред. При постановке биопроб пяти белым мышам линии BALB/c подкожно вводили по 0,2 мл контролируемого препарата и трем мышам по 0,2 мл ФБР. Наблюдение за животными проводили в течение 7 сут. До получения результатов, подтверждающих полную стерильность, белковые препараты хранили в ацетоне при температуре –20°C в помещениях лаборатории класса BSL3. При отсутствии роста на всех средах и гибели животных пробы считали стерильными и дальнейшие исследования проводили в помещениях, предназначенных для работы с различным материалом.

Проведение двумерного электрофореза и визуализация белков. Для получения электрофоретических проб ацетон удаляли, а осадки растворяли при перемешивании в буферном растворе, содержащем 8 М мочевины, 2 М тиомочевину, 20 мМ дитиотрейтол, 5% (о/о) амфолиты 3-10 (Bio-Rad), 5,5% CHAPS (в/о) и 2% NP40 (о/о) в течение 1 ч при температуре 24°C. Смешанный раствор детергентов CHAPS/NP-40 готовили предварительно из 0,6 г CHAPS и 200 мкл NP-40 в объеме 2 мл. Раствор мономеров в деионизованной воде объемом 100 мл содержал 0,9 г N,N'-метиленабисакриламида и 29,2 г акриламида. Полиакриламидные гели высотой 110 мм полимеризовали под слоем деионизованной воды в течение 2 ч в стеклянных капиллярах с внутренним диаметром 1,5 мм. Последовательно растворяли в 680 мкл деионизованной воды 1,0 г мочевины, 260 мкл мономеров, 40 мкл амфолинов (3–10), 75 мкл амфолинов (5–8), 120 мкл CHAPS/NP-40, доводили объем до 2 мл и непосредственно перед заполнением капилляров добавляли 4 мкл 10% персульфата аммония и 2 мкл TEMED. Пробы с содержанием общего белка от 30 мкг до 50 мкг наслаивали непосредственно на верхние части гелей, свободные части капилляров наполняли катодным буфером и закрепляли в ячейках камеры Protean II xi (Bio-Rad). В качестве катодного буфера применяли 50 мМ NaOH, анодным буфером служил 20 мМ раствор ортофосфорной кислоты. Изоэлектрическое фокусирование проводили в режиме нарастания напряжения от 100 В до 500 В течение первого часа, далее при 600 В течение 1 ч, 700 В – 18 ч, 900 В – 0,5 ч. По завершении изоэлектрического фокусирования столбики геля вытесняли из капилляров деионизованной водой и сразу же помещали их при непрерывном перемешивании в уравнивающий буфер, содержащий 6 М мочевины, 30% глицерин (о/о), 0,125 М трис-HCl (pH 6,8), 2% додецилсульфат натрия (в/о), 15 мМ дитиотрейтол, 0,02% бромфеноловый синий на 2,5 ч при 25°C. Уравновешенную буфером гелевую нить помещали на верхнюю часть полиакриламидного геля с линейным градиентом акриламида (7,5–15)%, фиксировали ее положение 1% расплавом агарозы и проводили электрофоретическое разделение во втором направлении в режиме постоянного тока 50 мА на один столбик геля в камере SE600X Chroma Deluxe (Hoefel). Гели окрашивали в течение 1 ч раствором Кумасси G-250, избыток красителя удаляли раствором, содержащим 7% уксусной кислоты и 5% этанола. Гели сканировали, цифровые изображения сравнивали с использованием программы InfoQuest™ FP (Bio-Rad) с корректировкой вручную путем маркирования повторяющихся сквозных белковых пятен в разных частях изображений. Выб-

Таблица 1. Результаты контроля стерильности препаратов белков *Y. pestis* И-2422 и И-3189 путем посева на питательные среды

Препарат	Рост на агаре Хоттингера с 2%-ной гемолизированной кровью, КОЕ					Рост в полужидкой тиогликолевой среде				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	Неинaktivированный из штамма <i>Y. pestis</i> И-2422	81	99	102	96	83	+	+	+	+
Инаktivированный из штамма <i>Y. pestis</i> И-2422	0	0	0	0	0	–	–	–	–	–
Неинaktivированный из штамма <i>Y. pestis</i> И-3189	83	79	92	111	89	+	+	+	+	+
Инаktivированный из штамма <i>Y. pestis</i> И-3189	0	0	0	0	0	–	–	–	–	–

«+» – наличие роста; «–» – отсутствие роста.

Таблица 2. Результаты контроля специфической стерильности препаратов белков *Y. pestis* И-2422 и И-3189 методом биопробы

Исследуемые препараты	Количество животных	Падеж, сут						
		1	2	3	4	5	6	7
Инаktivированный препарат белка из штамма <i>Y. pestis</i> И-2422	5	0	0	0	0	0	0	0
Инаktivированный препарат белка из штамма <i>Y. pestis</i> И-3189	5	0	0	0	0	0	0	0
Контроль (раствор ацетона в физрастворе)	5	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 3. Результаты масс-спектрометрии фрагментов 2D геля штамма *Y. pestis* И-3189

Обозначение белка	Молекулярная масса*, кДа	Данные, полученные в результате анализа аминокислотной последовательности белка (NCBI)			
		молекулярная масса, кДа	изоэлектрическая точка, pI	название белка	% гомологии (MASCOT Search Results)
P1	18,1	15,6	4,4	Caf1	91,3
P2	60,4	67,5	5,5	Фосфолипаза D <i>Enterobacteriaceae</i>	46,0

*рассчитана по результатам ДСН-ПААГ.

ранние пятна вырезали и использовали для масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрия и идентификация выбранных белков. Масс-спектры получали на приборе Reflex IV (Bruker Daltonics, Германия) MALDI-TOF в рефлекс-режиме, используя азотный лазер с длиной волны 337 нм и частотой импульса 9 Hz в режиме положительных ионов. Время задержки анализатора – 200 нс, напряжения на электроде ускорителя – 20,0 кВ, накапливающем электроде – 17,1 кВ, фокусирующей линзе – 9,4 кВ. Параметры масс-спектрометра были оптимизированы для диапазона m/z от 500 до 10 000,

используя для определения калибровочных констант масс-спектры пептидов. Идентификацию белков проводили с использованием программного обеспечения Mascot Software (Matrix Science Ltd., London, UK) и базы данных белковых последовательностей NCBI, таксон Bacteria (Eubacteria).

Результаты и обсуждение

После экспозиции микробной суспензии в течение 10 мин в 15%-ном растворе трихлоруксусной кислоты достигалась полная стерильность исследуемого образца. Спустя 7 сут наблюдения за посевами проб, содержащих инаktivированные белковые препараты штаммов *Y. pestis* И-2422 и И-3189, на плотной и полужидкой питательных средах констатировали отсутствие микробного роста. При этом на питательных средах с посевами неинaktivированных микробных суспензий наблюдали специфический рост *Y. pestis* (табл. 1). Таким образом, ростовые качества использованных питательных сред обеспечивали рост единичных клеток исходных микробных суспензий. Биопробные животные после введения смеси белковых препаратов *Y. pestis* И-2422 и И-3189 остались живы и не проявляли признаков заболевания на протяжении срока наблюдения (табл. 2).

Обеззараженные белковые осадки суспензировали и растворяли в буфере, содержащем детергенты и мочевины. В использованном нами методе изофокусирования белков в капиллярных трубках с внутренним диаметром 1,5 мм допустима нагрузка до 40 мкг общего белка на один столбик геля без потери разрешающей способности. Увеличение нагрузки приводило к возникновению существенных затруднений при извлечении гелей из капилляров, что прежде было отмечено для капилляров с гелями, несущими иммобилизованный градиент pH [4]. На рисунке 1 представлен двумерный электрофорез белков из штамма *Y. pestis* И-2422 после

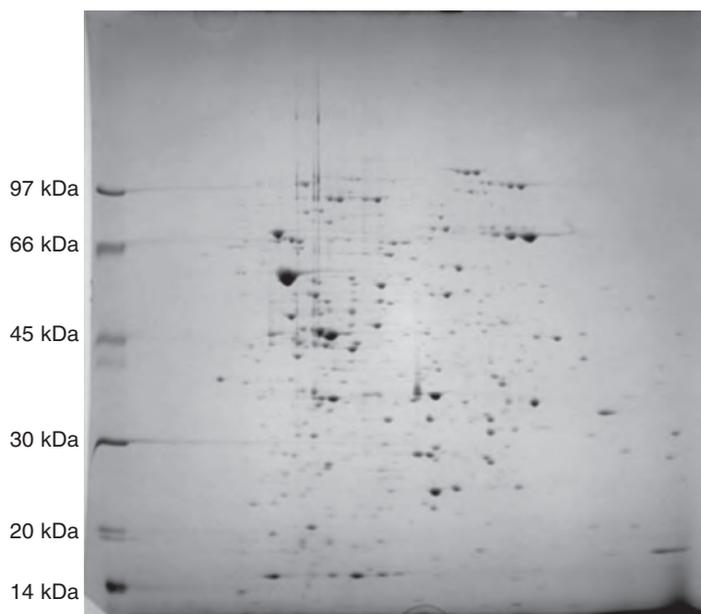


Рис. 1. Двумерный гель-электрофорез белков штамма *Y. pestis* И-2422. Слева в килодальтонах (kDa) обозначены размеры маркера молекулярных масс LMW 170446-01 (Amersham Pharmacia, USA).

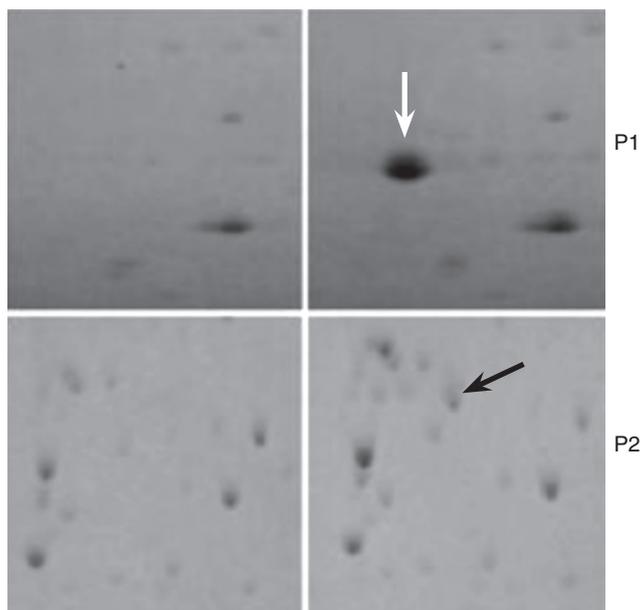


Рис. 2. Фрагменты электрофореграмм с найденными отличиями экспрессии белков штаммов *Y. pestis* И-2422 (левый столбец) и И-3189 (правый столбец). Белки P1 (Caf1) и P2 (Ymt) обозначены стрелками.

окраски Кумасси G-250. Электрофореграмма демонстрирует репрезентативность образца и высокую степень разделения белков, полученных после экстракции проб ацетоном вместе с полным отсутствием «шлейфов», характерных для образцов с ЛПС. Использование двух штаммов *Y. pestis*, содержащего и не содержащего плазмиду rFga, предполагало «запрограммированное» наличие или отсутствие белков, кодируемых данной плазмидой, что после подтверждения методом масс-спектрометрии представляло удобный инструмент для валидации предложенного метода обеззараживания инфекционного материала, а также приготовления проб для двумерного электрофореза. Данные, представленные на рисунке 2 и в таблице 3, подтверждают, что rFga⁺ штамм *Y. pestis* И-3189 продемонстрировал ожидаемое наличие белков: F1 антигена (Caf1) и Ymt (мышинный токсин, фосфолипаза D).

Предложенный метод получения белковых препаратов из штаммов возбудителя чумы обеспечивает их стерильность. Полученные белковые препараты в дальнейшем могут быть использованы для идентификации белков из штаммов чумного микроба путем двумерного электрофореза и масс-спектрометрии.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ №14-15-00599 «Поиск факторов избирательной вирулентности полевочных штаммов Yersinia pestis».

Литература

1. Westermeier R. Looking at proteins from two dimensions: A review on five decades of 2D electrophoresis. Arch Physiol Biochem. 2014;120(5):168-72. DOI: 10.3109/13813455.2014.945188
2. Pieper R, Huang Sh-T, Clark DJ, Robinson JM, Alami H, Parmar P.P, et al. Integral and peripheral association of proteins and protein complexes with Yersinia pestis inner and outer membranes. Proteome Sci. 2009 Feb 19;7:5. DOI: 10.1186/1477-5956-7-5

3. Правила соблюдения требований биологической безопасности при работе с ПБА I-II групп в помещениях 3 этажа корпуса № 1 НЭЗ, Оболенск 2017 г.
4. Hirano H, Kawasaki H, Sassa H. Two-dimensional gel electrophoresis using immobilized pH gradient tube gels. Electrophoresis. 2000;21(2):440-45. DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:2<440::AID-ELPS440>3.0.CO;2-X

References

1. Westermeier R. Looking at proteins from two dimensions: A review on five decades of 2D electrophoresis. Arch Physiol Biochem. 2014;120(5):168-72. DOI: 10.3109/13813455.2014.945188
2. Pieper R, Huang Sh-T, Clark DJ, Robinson JM, Alami H, Parmar P.P, et al. Integral and peripheral association of proteins and protein complexes with Yersinia pestis inner and outer membranes. Proteome Sci. 2009 Feb 19;7:5. DOI: 10.1186/1477-5956-7-5
3. Rules of observance of requirements of biological safety during work with PBA of I-II groups in areas 3 floor of building No. 1 of NEZ, Obolensk, 2017 (In Russian).
4. Hirano H, Kawasaki H, Sassa H. Two-dimensional gel electrophoresis using immobilized pH gradient tube gels. Electrophoresis. 2000;21(2):440-45. DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:2<440::AID-ELPS440>3.0.CO;2-X

Информация об авторах:

Красильникова Екатерина Александровна, аспирант ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Перовская Ольга Николаевна, научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Шайхутдинова Римма Завдатовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Иванов Сергей Андреевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Анисимов Андрей Павлович, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией микробиологии чумы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Information about authors:

Ekaterina A. Krasil'nikova, Postgraduate, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Ol'ga N. Perovskaya, Researcher of the Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Rimma Z. Shayhutdinova, PhD (Biol.), Senior Researcher of the Plague Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Sergey A. Ivanov, PhD (Biol.), Leading Researcher of the Plague Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Eugene A. Tyurin, PhD (Med.), Chief of the Laboratory of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Andrey P. Anisimov, Sc.D (Med.), deputy director for science, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Svetlana V. Dentovskaya, Sc.D (Med.), Head of the Plague Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

НОВОСТИ НАУКИ

Модифицированное соединение сахара против колонизации кишечника уропатогенными эшерихиями

Инфекции мочевых путей, как правило, возвращаются даже при лечении. Большинство этих инфекций вызвано *E. coli*, которые живут в кишечнике и распространяются в мочевыводящих путях. Новое исследование показало, что молекулярная приманка может уменьшить количество бактерий в кишечнике. Исследователи говорят, что с уменьшенным пулом бактерий, вызывающих заболевание, риск развития ИМП снижается.

Spaulding C.N. et al.
Selective depletion of uropathogenic E. coli from the gut by a FimH antagonist.
Nature. 2017; 546: 529-532.

Новые подходы в лечении бактериальных инфекций, формирующих биопленки

Бактериальные инфекции представляют серьезную проблему для здравоохранения, так как являются причиной значительной доли заболеваний и смертности. Ситуация осложняется старением населения и повышением восприимчивости к инфекциям, появлением значительного количества антибиотикоустойчивых бактериальных штаммов. Бактерии, которые образуют биопленки, колонизируют или заражают медицинские устройства или раны, их особенно трудно обрабатывать, поскольку биопленки по своей природе обладают высокой устойчивостью к антибиотикам. В обзоре Hughes G. и Webber M.A. обобщены основные особенности инфекций, формирующих биопленки, рассмотрены новые подходы и методы их лечения.

Hughes G., Webber M.A.
Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections.
British Journal of Pharmacology. 2017; 174: 2237–2246. doi: 10.1111/bph.13706.

Микробы в трюме

Микробиолог Стив Техтманн получил премию для молодых ученых DARPA за изучение микробных биосигналов, которые определяют, какие воды они проходят. Посещая различные морские порты мира, ученый ищет уникальные для каждого места микробы. Если геном микроба достаточно отличен от других, его можно использовать в качестве маркера, чтобы увидеть, где плавали корабли. Эта техника может быть использована в военных целях, а также для мониторинга окружающей среды.

Microbes in the bilge [Electronic resource].
URL: <https://phys.org/news/2017-06-microbes-bilge.html> (accessed 07.07.2017).

Современное состояние проблемы сибирской язвы

Н.А.Шишкова, Е.А.Тюрин, Л.И.Маринин, И.А.Дятлов, А.Н.Мокриевич

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
п. Оболенск, Российская Федерация

В статье рассматривается вопрос опасности сибирской язвы в современных условиях в связи с длительной сохранностью возбудителя заболевания в почве организованных и неорганизованных скотомогильников. Данная проблема актуальна на сегодняшний день, и от ее решения зависит не только экологическое и эпидемиологическое благополучие населения, проживающего на потенциально опасной территории и участвующего в обработке почв, но и возможное воздействие на природные почвенные ресурсы.

Ключевые слова: возбудитель сибирской язвы, сибиреязвенные скотомогильники, санирование скотомогильников

Для цитирования: Шишкова Н.А., Тюрин Е.А., Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н. Современное состояние проблемы сибирской язвы. Бактериология. 2017; 2(3): 33–40. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-33-40

Modern state of the anthrax problem

N.A.Shishkova, E.A.Tyurin, L.I.Marinin, I.A.Dyatlov, A.N.Mokrievich

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

The article considers the danger of anthrax in modern conditions in connection with the long-term preservation of the causative agent of the disease in the soil of organized and unorganized cattle graves. This is actual problem and the ecological and epidemiological welfare of the population living in a potentially dangerous territory and involved in the processing of soils, the possible impact on natural soil resources also depends on its solution.

Keywords: causative agent of anthrax, anthrax cattle cemetery, sanitation of cattle cemeteries

For citation: Shishkova N.A., Tyurin E.A., Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N. Modern state of the anthrax problem. Bacteriology. 2017; 2(3): 33–40. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-33-40

В последнее время во многих административных образованиях обращается пристальное внимание на использование земель, в том числе применявшихся ранее под различные сельскохозяйственные и бытовые нужды. Зачастую в администрациях отсутствует информация о том, как конкретно использовались земли. Отсутствие таких сведений может привести к пагубным с точки зрения эпидемиологии последствиям, так как на них могли располагаться неучтенные скотомогильники, в том числе и после захоронения животных, погибших от сибирской язвы.

Проблема борьбы с сибирской язвой для медицины и ветеринарии остается актуальной до настоящего времени, несмотря на длительное существование инфекции, многочисленные исследования, связанные с разработкой методов диагностики и созданием средств специфической профилактики. В силу расширения угрожаемых по сибирской

язве территорий вследствие разрушения в процессе природных и техногенных явлений скотомогильников или «проклятых полей», где сибиреязвенные микробы могут сохраняться в течение десятилетий, эпидемиологическая обстановка по сибирской язве остается довольно сложной и оценивается как напряженная и не имеющая тенденции к стабилизации [1].

Сибирская язва постоянно регистрируется на территории России в виде единичных и реже – групповых случаев. Инфекция наблюдалась практически во всех бывших республиках и областях России, в том числе в Московской, Калужской, Тульской, Воронежской, Липецкой, Тамбовской и др. За последние десять лет заболеваемость остается на невысоком, но стабильном уровне – ежегодно регистрировалось от 1 до 24 случаев сибирской язвы у людей. Наибольшее количество заболеваний пришлось на 2004,

Для корреспонденции:

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: turin@obolensk.org

Статья поступила 28.07.2017 г., принята к печати 26.09.2017 г.

For correspondence:

Eugene A. Tyurin, PhD (med.), Chief of the Laboratory of Biological Safety of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation.

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: turin@obolensk.org

The article was received 28.07.2017, accepted for publication 26.09.2017

2008 и 2010 гг. (16, 24 и 22 случая соответственно). По неполным данным, в 2014 г. в РФ сибирской язвой заболели 6 человек (Татарстан, Волгоградская, Орловская и Ростовская области). Иногда заболевание заканчивалось летальным исходом, что дает основание считать сибирскую язву опасной инфекцией.

Основным резервуаром возбудителя сибирской язвы и основным фактором, поддерживающим непрерывность эпизоотического процесса в очагах, является почва, которую можно считать вторым после инфицированных животных источником этого заболевания, поскольку доказана возможность заражения животных и людей непосредственно от почвы. Сибиреязвенная бактерия вне организма при доступе кислорода воздуха образует споры, вследствие чего обладает большой устойчивостью к высокой температуре, высушиванию и дезинфицирующим веществам. Инфицирование споровой формой *B. anthracis* отмечалось при заражении от контаминированной почвы в 3–14% общего числа заболеваний. Контаминированная спорами почва может оставаться источником инфекции в течение десятков лет. Описан случай заболевания сибирской язвой человека, заразившегося на месте захоронения трупов сельскохозяйственных животных, проведенного более 80 лет тому назад [2]. Имеется сообщение о выделении двух жизнеспособных штаммов возбудителя сибирской язвы из костей животных, найденных при археологических раскопках в Национальном Крюгер-парке (Южная Африка). Радиоуглеродный анализ этих костей показал, что возраст останков составляет 150–250 лет [3].

Материалы и методы

В качестве материалов для анализа опасности сибирской язвы в современных условиях использовали публикации в доступной литературе по эпидемиологической ситуации на определенных территориях, а также результаты собственных исследований.

Результаты и обсуждение

Наибольшую угрозу экологической безопасности представляют сибиреязвенные скотомогильники. К скотомогильникам относятся места для долговременного захоронения трупов сельскохозяйственных и домашних животных, павших или забитых во время эпизоотии в порядке предупреждения ее распространения [4]. Это территория, на которой может происходить инфицирование животных и людей, ведущее к вспышке заболевания сибирской язвой. Причины такой вспышки могут быть различными – от прямого вмешательства человека до геоморфологических процессов. Исходя из этого, производится оценка потенциальной опасности скотомогильника, которая зависит от того, где именно и как был создан скотомогильник. На территории Российской Федерации, а также в странах ближнего и дальнего зарубежья находится значительное количество неблагополучных по сибирской язве регионов [5, 6]. В частности, в Российской Федерации насчитывается около 35 тысяч стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов с почвенными очагами, в которых учтено 7940 сибиреязвенных

скотомогильников [1]. По сведениям Управления ветеринарии с Государственной ветеринарной инспекцией Минсельхозпрода Московской области на территории Московской области, в том числе и в г. Москве, в результате анализа данных за 1901–1988 гг. официально зарегистрировано 265 скотомогильников разных сроков захоронения сибиреязвенных трупов животных. Однако лишь по 42 из них указаны приблизительные координаты захоронения сибиреязвенных трупов животных, а по остальным нет вообще никаких данных о местах захоронений. При передаче земель от Московской области к Москве летом 2012 г. вместе с новыми территориями Москва получила и скотомогильники, 7 из которых не забетонированы и вокруг них не выделены санитарно-защитные зоны [7].

Наименее опасны оформленные и зарегистрированные скотомогильники. Иначе обстоит дело со старыми или забытыми скотомогильниками, которые попадают в сферу хозяйственной деятельности человека или подвергаются природным ландшафтными изменениям (например, осыпание склонов, подмывание берегов рек, формирование оврагов и впадин). К сожалению, на многих территориях до настоящего времени не налажен должный учет скотомогильников и контроль за их санитарным состоянием. Так, на основании паспортизации скотомогильников в Республике Бурятия выявлено 231 сибиреязвенное захоронение, из них всего лишь для 9 установлено точное местонахождение [8]. В 2000 г. в Тамбовской области источником заражения животных послужил разрытый при проведении земляных работ неучтенный скотомогильник, хотя ранее местность считалась благополучной по сибирской язве.

Особую опасность представляют заброшенные скотомогильники [9]. Регистрируются новые очаги болезни в ранее благополучной местности или «ожившие» старые неблагополучные пункты (СНП) при проведении земляных работ, в результате водной или ветровой эрозии, наводнений, землетрясений [10, 11]. Решить эту проблему в глобальном масштабе либо в масштабах нашей страны пока не удалось [12, 13].

Скотомогильники – специально отведенные участки земли для захоронения трупов животных. С точки зрения современных ветеринарно-санитарных требований, пользоваться скотомогильниками недопустимо, а имеющиеся подлежат ликвидации. Их берут на учет и по ветеринарным записям точно устанавливают эпизоотическую опасность. В зависимости от этого скотомогильники подразделяют на две категории: 1 – скотомогильники, где не были захоронены трупы животных, павших от сибирской язвы; 2 – скотомогильники с захоронением таких трупов. Ко второй категории относят также скотомогильники без точных данных о характере захоронения трупов, но при регистрации в данной местности сибирской язвы.

В настоящее время около 30% скотомогильников (1700) являются бесхозными. В результате многие захоронения не обозначены ни на картах, ни на местности. Однако кроме бесхозных скотомогильников существуют еще и неучтенные захоронения. Более всего их около пустующих ныне сел и деревень. Изначально эти захоронения находились под контролем местных ветеринарных служб, но за многие десятилетия в результате многочисленных реорганизаций и пере-

дачи функций контроля за скотомогильниками от одного ведомства к другому архивы с данными об этих скотомогильниках, как правило, утрачены и не могут быть восстановлены, так как очевидцев из старожилов близлежащих деревень уже давно нет в живых. Более того, вплоть до сококовых годов 20-го века павший по любым причинам скот закапывали обычно недалеко от деревни, не выясняя причины, по которой случился падеж. Такие ямы-захоронения были практически у каждой деревни. Учета этих захоронений и контроля за их состоянием не было вовсе. Для любых захоронений (в том числе сибиреязвенных скотомогильников) критерии выбора места были традиционно одинаковыми – на высоком, незатопляемом участке. Именно эти территории в настоящее время – самый лакомый кусок для застройщиков, в первую очередь, элитного жилья. Все возрастающими темпами осваиваются земли под промышленное строительство, новые дороги и трубопроводы, разработку и освоение новых месторождений полезных ископаемых, забор и вывоз грунта. И, вполне вероятно, при этом могут быть затронуты территории, зараженные еще в доисторические времена сибирской язвой. Нельзя сбрасывать со счетов и многочисленных кладоискателей, для которых любое найденное ими захоронение – объект самого пристального изучения. Любой из этих факторов может вызвать вспышку эпидемии смертельного заболевания. Распространению эпидемии могут поспособствовать талые воды и паводки, размывающие расконсервированные захоронения. Угроза вскрытия сибиреязвенных скотомогильников и возникновения эпидемии сибирской язвы на территории России возрастает сегодня многократно [14]. Согласно имеющейся информации, в Тверской области в 19 веке было около 500 вспышек сибирской язвы, в 20 веке – около 480. Предположительно, на дне Ивановского водохранилища находятся 43 затопленных скотомогильника и еще 91 размещены в водоохранной зоне. Исторически известно, что в связи со строительством водохранилища, в 1936 г. на указанной территории наблюдалась крупная вспышка сибирской язвы [15].

Подтверждением опасности скотомогильников является выделение нами возбудителя сибирской язвы из проб почвы, взятых на месте старого скотомогильника, существующего более 70 лет на берегу Ивановского водохранилища в Тверской области [16].

Отбор проб производили в соответствии с «Методическими рекомендациями по отбору проб почвы для бактериологического исследования на наличие возбудителей сибирской язвы и актиномицетов – антагонистов» [17].

Лабораторные исследования проб почвы для выявления возбудителя сибирской язвы производили в соответствии с нормативными документами [18].

С целью обнаружения и выделения возбудителя сибирской язвы использовали микробиологические (высевы на питательные среды), биологические (заражение лабораторных животных) и генетические (полимеразная цепная реакция) методы исследований.

Согласно данным литературы, вероятность обнаружения в почве вегетативных клеток возбудителя сибирской язвы невелика [19, 20], поэтому для отсеивания неспоровых культур провели термообработку почвенных взвесей при 83°C

в течение 13 минут и затем высевали эти пробы на питательные среды: LB-агар с полимиксином, дифференциально-диагностическую среду с фенолфталеинфосфатом натрия или с бромтимоловым синим. Это позволило нам сузить круг поиска *B. anthracis*.

После термостатирования отбирали колонии сероватоматовые, шероховатые, с плоской или слегка выпуклой поверхностью, ворсистой бахромчатой периферией, состоящей из нитей микробных палочек, отходящих от центральной части колонии, что придает ей вид локонов волос, львиной гривы или головы медузы. С дифференциально-диагностических сред также отбирали характерные колонии. Затем все подозрительные колонии засеивали в бульон Хоттингера и проводили оценку характера роста культур.

В классическом случае через 16–24 ч культивирования в жидких средах отмечается рост на дне пробирок в виде сеточки, нитей или хлопка (комка ваты), бульон остается прозрачным или слегка опалесцирует. В то же время в 2–5% случаев у сибиреязвенных штаммов отмечаются отклонения от типичного роста в бульоне [19, 20] – наблюдается равномерное помутнение бульона, образование пристеночного кольца и аморфного или трудно разбиваемого осадка.

В результате при первичном анализе с чашек с питательным агаром отобрали более сотни подозрительных колоний. После оценки характера роста в бульоне осталось около 20 подозрительных культур. Проверили фаголизательность выделенных культур специфическими сибиреязвенными бактериофагами Гамма А-26 и Fah ВНИИВВиМ. Отобрали четыре штамма, которые лизировались специфическими бактериофагами, и несколько штаммов, которые фагами не лизировались.

Проведенные исследования позволили выделить из почвы скотомогильника Тверской области шесть изолятов, которые получили обозначения П-1, П-4о, П-4, П-4ш, П-4с и П-14. При более тщательном исследовании к типичным штаммам *B. anthracis* отнесли только два изолята – штаммы П-1 и П-4о. Отсутствие капсулы при культивировании этих штаммов на бикарбонатно-сывороточном агаре, вероятно, связано с их частичной аттенуацией в процессе длительного нахождения в почве. Характеристики штаммов приведены в таблице.

Для идентификации культур использовали ПЦР с помощью тест-системы ПЦР «ГенСиб», а также с разработанными в ГНЦ ПМБ праймерами на капсульную плазмиду и на компоненты сибиреязвенного токсина – протективный антиген, летальный и отечный факторы. При исследовании культур изолятов П-1 и П-4о выявлены фрагменты ДНК, соответствующие генам протективного антигена сибиреязвенного микроба. У остальных выделенных культур фрагментов ДНК, соответствующих генам протективного антигена сибиреязвенного микроба, не обнаружено.

Таким образом, из отобранных 80 проб земли были выделены три типа сибиреязвенных культур. Некоторые из них имели свойства, типичные для *B. anthracis*, другие отличались по ряду признаков. Это согласуется с имеющимися сведениями о выделении из объектов внешней среды, наряду с типичными штаммами, атипичных мутантов, значение которых в эпидемиологии и патогенезе сибирской язвы остается неясным и требует изучения [19, 20].

Таблица. Свойства штаммов бацилл, выделенных из почвы сибиреязвенных скотомогильников в Тверской и Нижегородской областях

Место выделения	Штамм	Свойства штаммов								
		проба с фагом Гамма А-26	проба с фагом Фаh ВНИИВВиМ	зона ингибирования на среде с ампициллином (мм)	гемолиз на кровяном агаре	фосфатазная активность	проба с γ-глобулином	морфология колоний на бикарбонатно-сывороточной среде	подвижность в полужидком агаре	рост в L-бульоне
Тверская область	П-1	+	+	22	-	-	+	Шероховатые	-	Типичный рост
	П-4о	+	+	10	-	-	+	Шероховатые	-	Типичный рост
	П-4	+	+	3	+	-	+	Шероховатые	-	Осадок, бульон мутный
	П-4ш	-	-	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон мутный
	П-4с	-	-	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон мутный
	П-14	-	-	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон прозрачный
Нижегородская область	spp. 51	+	+	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон мутный
	spp. 52	+	-	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон мутный
	spp. 53	-	-	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон мутный
	spp. 54	-	-	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон мутный
	spp. 55	+	-	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон мутный
	spp. 56	-	-	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон мутный
	spp. 57	+	+	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон мутный
	spp. 58	+	+	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон мутный
	spp. 59	+	+	0	+	+	-	Шероховатые	+	Осадок, бульон мутный
	<i>B. anthracis</i> СТИ 1	+	+	32	-	-	+	Шероховатые	-	Типичный рост
<i>B. anthracis</i> 71/12	+	+	30	-	-	+	Слизистые	-	Типичный рост	

По заданию Роспотребнадзора сотрудники ФБУН ГНЦ ПМБ участвовали в обследовании старого скотомогильника в Нижегородской области [21]. Было взято 100 образцов почвы из скотомогильника и прилегающей территории на удалении от него на 200 м.

В результате микробиологических исследований были отобраны клоны, которые лизировались сибиреязвенным фагом Гамма-А26, а некоторые – также фагом Фаh ВНИИВВиМ. Поскольку в литературе имеются сведения о фагоустойчивых штаммах *B. anthracis* [20], провели дополнительные исследования этих культур. С целью дальнейшей дифференциации штаммов культуру высевали на плотную питательную среду с противосибиреязвенным иммуноглобулином. Штаммы, которые лизировались сибиреязвенными бактериофагами, давали отличную преципитацию на агаре с иммуноглобулином, а у не лизировавшихся штаммов преципитации не наблюдалось (таблица).

Для подтверждения наших изысканий мы проверили устойчивость выделенных штаммов к антибиотикам, в частности к бензилпенициллину, по тесту жемчужного ожерелья, а также с помощью дисков. На среде с пенициллином выделенные из почвы микробные культуры дали отрицательный тест жемчужного ожерелья.

На рисунке 1 приведены результаты высевов типового сибиреязвенного штамма (СТИ-1) и одного из выделенных штаммов (*Bacillus spp. 55*) на среду с фенолфталеинфосфатом натрия, а также оценки чувствительности к антибиотикам и бактериофагу Гамма А-26.

Типовой сибиреязвенный штамм из-за отсутствия фосфатазной активности не изменил цвета колоний, а штамм из скотомогильника резко поменял окраску культуры из-за наличия фосфатазы. В центре чашки – зона лизиса при воздействии специфического сибиреязвенного бактериофага Гамма-А26 (одинакова для обоих штаммов). Штамм *B. anthracis* СТИ-1 чувствителен к пенициллину и стрептомицину, а штамм *Bacillus spp. 55* – лишь к стрептомицину.

При использовании тест-системы ПЦР «ГенСиб» в ДНК выделенных культур не выявлено фрагментов, соответствующих генам протективного антигена, и капсулы сибиреязвенного микроба, что не позволило отнести выделенные культуры к *B. anthracis*.

При исследовании изолятов из скотомогильника Нижегородской области, несмотря на то, что часть из них лизируется специфическими сибиреязвенными фагами Гамма А-26 и Фаh-ВНИИВВиМ, ни один из них не может быть отнесен к возбудителю сибирской язвы по общей совокупности свойств, в частности, они устойчивы к пенициллину, обладают фосфатазной активностью, подвижны, не обладают вирулентностью для белых мышей.

Таким образом, из почвы скотомогильника Нижегородской области выделено 9 подозрительных культур, изучение свойств которых показало их принадлежность к груп-

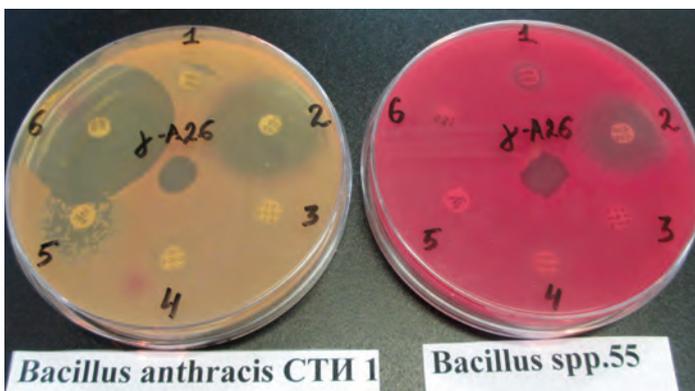


Рис. 1. Фосфатазная активность и устойчивость к антибиотикам и фагу Гамма А-26 типового сибиреязвенного штамма (СТИ-1) и штамма, выделенного из почвы (*Bacillus spp. 55*): 1 – полимиксин; 2 – стрептомицин; 3 – триметоприм; 4 – котримоксазол; 5 – цефтазидим; 6 – бензилпенициллин.

пе *B. cereus*, что подтвердило сведения литературы о выделении из почвы спорообразующих сапрофитов, имеющих некоторые сходства с возбудителем сибирской язвы [19, 20].

Приведенные выше два примера экспериментальных работ по изучению старых скотомогильников ярко иллюстрируют тезис об их опасности, с одной стороны, вследствие выделения жизнеспособных культур сибиреязвенного микроба, а с другой – неких подозрительных бактерий, сходных с возбудителем сибирской язвы, но требующих тщательного их изучения в плане опасности для человека и животных.

Что же может предложить современная наука для решения проблем деконтаминации скотомогильников?

Различают агротехнические и санитарные мероприятия по оздоровлению почвы и предупреждению заболеваний животных почвенными инфекциями. В качестве мероприятий по санированию скотомогильников первой группы ближайшей осенью после их закрытия выжигают травяную растительность, сжигают кости, мусор и т. п. После этого на территории высаживают кустарники и деревья, особенно хвойных пород, мешающие росту травы. На скотомогильниках без посадок деревьев производят посев многолетних трав, но использовать их в корм можно только на третий год, при условии, что участок скотомогильника, где выжжена трава, перепахивали 2 года подряд.

При ликвидации скотомогильников второй группы территорию обрабатывают дезинфицирующими препаратами. Вокруг роют канаву, устраивают изгородь и сажают колючие кустарники, чтобы исключить возможность проникновения на скотомогильник людей и животных. На изгороди на видном месте делают надпись: «Сибиреязвенный скотомогильник закрыт». Эти скотомогильники должны быть на постоянном учете. На их территории осенью несколько лет подряд сжигают травяную растительность, а затем высаживают саженцы хвойных растений. На каждый ликвидированный скотомогильник заводят учетные карточки.

Агротехнические мероприятия включают в себя введение соответствующих севооборотов, вспашку (азрацию) почвы, внесение органических и минеральных удобрений, осушение заболоченных участков, создание благоприятных условий для развития культурных растений.

Зачастую возникает вопрос о необходимости обеззараживания небольших участков почвы, например, на месте падежа или вынужденного убоя больного животного. При этом всегда надо учитывать вид почвы, и в зависимости от этого применять разные дезинфицирующие вещества в определенных концентрациях. Участки почвы, загрязненной возбудителями особо опасных инфекционных болезней (сибирской язвы, эмкара и др.), обеззараживают термическим путем (выжиганием), газовым методом – смесью окиси этилена и бромистого этила (ОКЭБМ) или бромистым метилом. Но эти препараты обладают высокой токсичностью.

Главам администраций субъектов РФ рекомендовано: «Провести учет всех сибиреязвенных скотомогильников и мест захоронения трупов сибиреязвенных животных с использованием топографических способов обозначения их на местности, в том числе с определением географических координат, и определить хозяйственную принадлеж-

ность этих сибиреязвенных скотомогильников и биометрических ям» [1].

Полевым изысканиям должно предшествовать изучение документов о случаях заболевания сибирской язвой животных в данной местности. При невозможности определить место захоронения по описанию и по карте-схеме проводятся комиссионные изыскания на местности. В комиссию включаются представители государственного санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора, комитета по земельным ресурсам, представители местных администраций, граждане, являющиеся очевидцами захоронений или знающие их местонахождение.

В случаях невозможности определения конкретного места захоронения ориентируются на особенности рельефа местности. Как правило, земля под старым скотомогильником образует небольшую впадину, которая выделяется на общем фоне, имеет правильную геометрическую форму, а края впадины возвышаются над уровнем окружающего грунта. Кроме того, в лесистой местности можно заметить, что в самой впадине и вокруг нее деревья несколько моложе, чем в общем массиве.

Установив место предполагаемого захоронения, проводят историческую оценку его месторасположения. При этом сопоставляют дату вспышки сибирской язвы с возрастом деревьев, расположенных в округе, бывшее расположение и конфигурацию населенных пунктов, животноводческих объектов, дорог и скотогонных трасс. Тем самым подтверждается или опровергается вероятность захоронения сибиреязвенных трупов в исследуемом месте.

В санитарно-защитной зоне почвенных очагов сибирской язвы не разрешаются отвод земельных участков для проведения изыскательных, гидромелиоративных, строительных и других работ, связанных с выемкой и перемещением грунта, последующим затоплением, подтоплением или изменением уровня грунтовых вод, а также передача в аренду, продажа в личную собственность, выделение под сады, огороды или иное землепользование участков территории в непосредственной близости к почвенным очагам сибирской язвы.

Именно от скотомогильников, не имеющих собственника, исходит опасность распространения в среде обитания человека патогенных микроорганизмов.

Скотомогильники, не имеющие собственника, образуются в результате банкротства сельхозпредприятий либо возводятся хозяйственным способом без надлежащего оформления земельных участков и согласований с контролирующими органами.

Так как споры сибирской язвы обладают способностью сохранять свою смертельную болезнетворность в течение сотен лет, то одно из направлений борьбы с биологической опасностью – обозначение, консервация и обеззараживание существующих скотомогильников.

Все сибиреязвенные скотомогильники должны удовлетворять определенным санитарным требованиям в соответствии с п.п. 5.6-5.10 «Ветеринарно-санитарных правил сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов» [22]. В специально оборудованных скотомогильниках должна быть так называемая биотермическая яма, т.е. яма, выложенная кирпичом и заделанная глиняным замком и



Рис. 2. Обозначение сибирезязвенного скотомогильника в Тверской области.

(или) покрытая бетонным саркофагом. Территория скотомогильника (биотермической ямы) должна быть огорожена глухим забором высотой не менее 2 м с въездными воротами. С внутренней стороны забора по всему периметру должна быть выкопана траншея глубиной 0,8–1,4 м и шириной не менее 1,5 м с устройством вала из вынутаго грунта. Обязательно наличие предупреждающего знака: «Опасно, сибирская язва!» Ранее это почти нигде не делалось. Практически у каждой деревни имелись обычные ямы-захоронения животных, погибших от любых причин, в том числе – от сибирской язвы. Поэтому до настоящего времени оборудование многих скотомогильников не соответствует ветеринарным и санитарным требованиям. Вот как обозначен скотомогильник в 2003 г. в Тверской области (рис. 2).

На стволе березы прибита табличка с надписью «сибирязвенный скотомогильник», на которую нанесены слова «брежня», «туалет». Других обозначений, ограждений нет. Вокруг заросли кустарника.

Рисунок 3 иллюстрирует состояние скотомогильника в июне 2011 г. в Кировской области (а). В нарушение требований законодательства место захоронения биологических отходов со спорами сибирской язвы огорожено деревянным забором высотой 150–170 см из жердей с промежутками между ними в 20–25 см, водозаполненная траншея внутри ограждения не имеет достаточных глубины и ширины, высота кургана над скотомогильником ниже необходимого уровня.

На этом же рисунке приведен пример оборудования скотомогильника (б) в соответствии с Санитарными требованиями.

В последнее время появились административные решения вопроса борьбы с безхозными скотомогильниками, а значит, и с возбудителем сибирской язвы, в различных регионах Российской Федерации. Эти Постановления Администраций различных областей и республик были приняты только в 2013–2014 гг.

- Постановление Правительства Самарской области от 19.08.2014 №499 «Об утверждении Порядка ликвидации неиспользуемых скотомогильников на территории Самарской области».

- Постановление Правительства Тульской области от 30 октября 2013 года №592 «Об утверждении порядка ликвидации неиспользуемых скотомогильников на территории Тульской области».

- Постановление Правительства Республики Мордовия от 05 августа 2013 года №311 «Об утверждении Порядка ликвидации неиспользуемых скотомогильников на территории Республики Мордовия».

- Постановление Правительства Ивановской области от 25.12.2013 №562-п «Об утверждении Порядка ликвидации неиспользуемых скотомогильников на территории Ивановской области».

- Постановление Правительства Республики МАРИЙ ЭЛ от 30 декабря 2012 г. №496 «Об утверждении порядка лик-



Рис. 3. Обозначение сибирезязвенного скотомогильника в Кировской области в июне 2011 г. (а). Оборудование скотомогильника в соответствии с Санитарными требованиями (б). (Фото: Delonomer.ru)

видации неиспользуемых скотомогильников на территории республики МАРИЙ ЭЛ».

• Постановление Администрации Костромской области от 31 июля 2014 года №318-а «Об утверждении порядка ликвидации неиспользуемых скотомогильников на территории Костромской области».

• Постановление Совета Министров Республики Крым от 21 октября 2014 года №384 «Об утверждении Порядка ликвидации неиспользуемых (бесхозных) скотомогильников (биотермических ям) на территории Республики Крым».

Вышеперечисленные меры позволяют поддерживать достаточный уровень санитарно-эпидемиологического благополучия на территории по предотвращению обострения эпидемиологической ситуации, снизить опасность заражения сибирской язвой и использовать земли по их прямому назначению.

Литература

- Онищенко ГГ. Постановление «О мерах совершенствования мероприятий по профилактике сибирской язвы в Российской Федерации» № 41 от 27.06.2008 г.
- Адамович ВЛ, Белицкая ГА, Кукарекин НФ. К вопросу оздоровления почвенных очагов сибирской язвы в Брянской области. В сб.: Вопросы эффективности противосибиреязвенных мероприятий. Матер. Всесоюз. науч. симпозиума IX Пленарного заседания междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1974, С. 170-171.
- Van de Vos. The ecology of anthrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11–13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990;68:19-23.
- Николаенко ДН. Скотомогильник как объект и предмет естественно-научного исследования. Случай Украины. Энвайронментальная эпидемиология. 2011;2:120.
- Маринин ЛИ, Онищенко ГГ, Степанов АВ, Старицын НА, Померанцев АП, Алешкин ВА, Афанасьев СС. Микробиологическая диагностика сибирской язвы. М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999, 224 с.
- Черкасский БЛ. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М., 2002, 384 с.
- Роспотребнадзор: Угроза возникновения сибирской язвы на Алтае есть постоянно [Electronic resource]. URL: <http://www.rosbalt.ru/russia/2012/08/28/1027283.html> (accessed: 06.09.2017).
- Симонова ЕГ, Галкин ВВ, Локтионова МН, Ладный ВИ. Сибиреязвенные скотомогильники на территории РФ и их биологическая безопасность. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2010;4:23-6.
- Галиуллин АК, Шакиров МС, Фаизов ТХ. Эпизоотический потенциал сибиреязвенных захоронений на территории Республики Татарстан. Ученые записки КГАВМ. 2008;192:53-5.
- Амосов НМ. Проблемы медицинской кибернетики. М.: Наука, 1972, 311 с.
- Бакулов ИА, Третьяков АД. Руководство по общей эпизоотологии. М.: Колос, 1979, 424 с.
- Бакулов ИА, Гаврилов ВА, Селиверстов ВВ. Сибирская язва (Антракс); новые страницы в изучении «старой» болезни. Владимир: Посад, 2001, 287 с.
- Гаврилов ВА. Биологическая опасность сибиреязвенных скотомогильников и перспективы решения существующей проблемы. Жизнь без опасностей. 2008;4:81-4.
- Гаврилов ВА, Тихонов ИВ. Опасность существования сибиреязвенных почвенных очагов и затопленных скотомогильников. Ветеринарная медицина. 2010;2:55-8.
- Кноп АГ. Влияние антропогенного преобразования природы на почвенные очаги сибирской язвы. Современные проблемы зоонозных инфекций. М., 1981, с. 25-29.
- Шишкова НА, Кравченко ТБ, Маринин ЛИ, Мокриевич АН. Идентификация возбудителя сибирской язвы, выделенного из почвы скотомогильника. Проблемы особо опасных инфекций. 2011;4(110):53-6.
- «Методические рекомендации по отбору проб почвы для бактериологического исследования на наличие возбудителя сибирской язвы и актиномицетов-антагонистов», утвержденные зам. начальника ГУКИ Минздрава СССР 27.09.84 г.
- Методические указания «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы». МУК 4.2.2413-08.
- Буравцева НП, Неляпин НМ, Еременко ЕИ. Выделение из почвы атипичных штаммов сибиреязвенного микроба. Тезисы докладов научно-практической конференции. Ставрополь, 1983, с. 16-17.
- Маринин ЛИ, Онищенко ГГ, Кравченко ТБ, Дятлов ИА, Тюрин ЕА, Степанов АВ, Никифоров ВВ. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: «Гигиена», 2008, 406 с.
- Шишкова НА, Маринин ЛИ, Мокриевич АН, Дятлов ИА. Свойства спорообразующих микроорганизмов, выделенных из почвы скотомогильника в Нижегородской области. Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в противозидемической защите населения». Под ред. д.м.н. проф. Ефимова Е.И. Н. Новгород, 2014, с. 183-187.
- Ветеринарно-санитарные правила сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов № 3-7-2/469, 1995.

References

- Onishchenko GG. The decree "On measures to improve interventions for the prevention of anthrax in the Russian Federation" No. 41 dated 27.06.2008. (In Russian).
- Adamovich VL, Belitskaya GA, Kukarekin NF. K voprosu ozdorovleniya pochvennykh ochagov sibirskoi yazvy v Bryanskoj oblasti [To the question of improvement of soil foci of anthrax in the Bryansk region.]. In: Voprosy effektivnosti protivosibireyazvennykh meropriyatii [Issues of efficiency protivovirusnyh events]. Materials all-Union scientific Symposium of the IX Plenary meeting of the interdepartmental scientific-methodological Commission against anthrax. Moscow, 1974, pp. 170-171. (In Russian).
- Van de Vos. The ecology of anthrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11–13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990;68:19-23.
- Nikolaenko DN. Skotomogil'nik kak ob'ekt i predmet estestvenno-nauchnogo issledovaniya. Sluchai Ukrainy. Environmental Epidemiology. 2011;2:120. (In Russian).
- Marinin LI, Onishchenko GG, Stepanov AV, Staritsyn NA, Pomerantsev AP, Aleshkin VA, Afanas'ev SS. Mikrobiologicheskaya diagnostika sibirskoi yazvy [Microbiological diagnosis of anthrax]. Moscow, 1999, 224 p. (In Russian).
- Cherkasskii BL. Epidemiologiya i profilaktika sibirskoi yazvy [Epidemiology and prevention of anthrax]. Moscow, 2002, 384 p. (In Russian).
- Rospotrebnadzor: The risk of anthrax in the Altai have constantly [Electronic resource]. URL: <http://www.rosbalt.ru/russia/2012/08/28/1027283.html> (accessed: 06.09.2017). (In Russian).
- Simonova EG, Galkin VV, Loktionova MN, Ladnyi VI. Anthrax cattle burial grounds in Russia and their biosafety. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2010;4:23-6. (In Russian).
- Galiullin AK, Shakirov MS, Faizov TKH. Epizooticheskie potentsial sibiriyazvennykh zakhoroneni na territorii Respubliki Tatarstan. Uchenye zapiski KGAVM. 2008;192:53-5. (In Russian).
- Amosov NM. Problemy meditsinskoj kibernetiki [The problem of medical cybernetics]. Moscow: "Nauka" Publ., 1972, 311 p. (In Russian).
- Bakulov IA, Tret'yakov AD. Rukovodstvo po obshchei epizootologii. Moscow: "Kolos" Publ., 1979, 424 p. (In Russian).

12. Bakulov IA, Gavrilov VA, Seliverstov VV. Sibirskaya yazva (Antraks); novye stranitsy v izuchenii «staroi» bolezni. Vladimir: "Posad" Publ., 2001, 287 p. (In Russian).
13. Gavrilov VA. Biologicheskaya opasnost' sibireyazvennykh skotomogil'nikov i perspektivy resheniya sushchestvuyushchei problemy. Zhizn' bez opasnostei. 2008;4:81-4. (In Russian).
14. Gavrilov VA, Tikhonov IV. Opasnost' sushchestvovaniya sibireyazvennykh pochvennykh ochagov i zatoplennykh skotomogil'nikov. Veterinarnaya meditsina. 2010;2:55-8. (In Russian).
15. Knop AG. Vliyaniye antropogennogo preobrazovaniya prirody na pochvennyye ochagi sibirskoi yazvy. Sovremennyye problemy zoonoznykh infektsii [The impact of anthropogenic transformation of nature in soil foci of anthrax. Modern problems of zoonotic diseases]. Moscow, 1981, pp. 25-29. (In Russian).
16. Shishkova NA, Kravchenko TB, Marinin LI, Mokrievich AN. Identification of Bacillus anthracis Isolated from Soil of the Animal Burial Site. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2011;4(110):53-6. (In Russian).
17. Guidelines for soil sampling for bacteriological examination for the presence of anthrax and actinomycetes-antagonists", approved by the Deputy head of STATE of the Ministry of health of the USSR 27.09.84 G. (In Russian).
18. Methodical instructions "Laboratory diagnosis and detection of anthrax". MUK 4.2.2413-08. (In Russian).
19. Buravtseva NP, Nelyapin NM, Eremenko EI. Isolation from soil of atypical strains of anthrax microbe. Proceedings of scientific-practical conference. Stavropol, 1983, pp. 16-17. (In Russian).
20. Marinin LI, Onishchenko GG, Kravchenko TB, Dyatlov IA, Tyurin EA, Stepanov AV, Nikiforov VV. Sibirskaya yazva cheloveka: epidemiologiya, profilaktika, diagnostika, lechenie [Anthrax: epidemiology, prevention, diagnosis, treatment]. Moscow: «Gigiena» Publ., 2008, 406 p. (In Russian).
21. Shishkova NA, Marinin LI, Mokrievich AN, Dyatlov IA. Svoystva sporoobrazuyushchikh mikroorganizmov, vydelennykh iz pochvy skotomogil'nika v Nizhegorodskoi oblasti [Properties of spore-forming microorganisms isolated from soils of cattle cemetery in the Nizhny Novgorod region]. Materials of all-Russian scientific-practical conference "Innovative technologies in anti-epidemic protection of the population" Ed by. Efimov EI. Nizhny Novgorod, 2014, pp. 183-187. (In Russian).
22. Veterinary-sanitary rules of gathering, recycling and destruction of biological waste № 3-7-2/469, 1995. (In Russian).

Информация об авторах:

Шишкова Нина Андреевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Маринин Леонид Иванович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Мокриев Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Information about authors:

Nina A. Shishkova, Cand. Sci. (Biol.), leading researcher Laboratory of Anthrax microbiology Department of Particularly dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Leonid I. Marinin, Cand. Sci. (Med.), leading researcher Laboratory of Anthrax microbiology Department of Particularly dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, Sc.D (Med), professor, director of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Alexander N. Mokrievich, Sc.D (Med), Head of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

НОВОСТИ НАУКИ

Кормите вирус, не кормите бактерию

Руководствуясь принципом «Держите ноги в тепле, желудок в голоде, а голову в холоде», ученые Йельского Университета (США) исследовали влияние передачи питательных веществ во время вирусной либо бактериальной инфекции. Мышей инфицировали *Listeria monocytogenes*, бактерией, вызывающей пищевые отравления. При этом мыши, которых насильно кормили глюкозой, умирали, в то время как голодные мыши выздоравливали. С другой стороны, среди мышей, зараженных вирусом гриппа, выживали те, которых кормили глюкозой, голодные же умирали. В ходе дальнейших исследований установили, что метаболические потребности животных менялись в зависимости от того, с чем боролась иммунная система.

Wang A., Huen S.C., Luan H.H., Yu S., Zhang C., Gallezot J.-D., et al.
Opposing Effects of Fasting Metabolism on Tissue Tolerance in Bacterial and Viral Inflammation.
Cell. 2016; 166(6): 1512–1525.e12. doi:10.1016/j.cell.2016.07.026

Тезисы докладов III Национального конгресса бактериологов. В рамках XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНОЭМП)

Москва, 16–17 ноября 2017 г.

Новые транспортные среды для клинической микробиологии

Азанчевская С.В., Гирина Н.С., Сухаревич М.Э., Поляк М.С.

ООО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии»
(НИЦФ), г. Санкт-Петербург

Целью настоящей работы было создание микробиологических транспортных сред, обеспечивающих длительное сохранение жизнеспособности бактерий при широком диапазоне температурных режимов, включая экстремальные (до -70°C). Предложены две рецептуры транспортных сред (№1 и №2), включающие криопротекторы и компоненты, обеспечивающие стабильные показатели плотности, гомогенности, цветности, pH и редокс-потенциала, в том числе при низких температурах с последующим их размораживанием.

Разработана технология приготовления новых транспортных сред с сохранением их качественных показателей при хранении: среда №1 – в течение 9 мес, среда №2 – в течение 6 мес.

Способность новых транспортных сред обеспечивать выживаемость бактерий при ограниченном или полном отсутствии их репродукции определена в сравнении с аналогичными свойствами известных транспортных сред Эймса и Кери–Блейра. В экспериментах были использованы грамотрицательные и грамположительные бактерии, в том числе семейства кишечных, палочки сине-зеленого гноя, стафилококки, цепочковые кокки различных родов (включая пневмококки).

В контрольных транспортных средах при низких температурах (-18°C и -70°C) происходила гибель микроорганизмов, достигая 80–100% от числа клеток инокулюма. Наиболее чувствительными к действию низких температур в транспортной среде Эймса были цепочковые кокки (стрептококки группы А и пневмококки), а также отдельные штаммы сальмонелл и шигелл. Транспортная среда Кери–Блейра не сохраняла в этих условиях жизнеспособность шигелл и ряда штаммов сальмонелл, кишечных палочек и клебсиелл. Опытные транспортные среды обеспечивали при аналогичных температурных режимах сохранение жизнеспособности от 40 до 100%

клеток в течение 96 ч и от 30 до 80% клеток при этих же температурах в течение месяца. В частности, среда №1 обеспечивала выживаемость более 40–50% клеток *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus pneumoniae*, а среда №2 – более половины инокулюма бактерий семейства кишечных, включая представителей родов *Salmonella* и *Shigella*.

Эффективность новых транспортных сред показана при внесении в них инокулюма как в виде взвеси, так и на тампонах.

Опыт выделения и идентификации листерий из объектов внешней среды и биоматериала на территории Вологодской области

Алексеева Е.А.¹, Фурсова Н.К.²

¹ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области», г. Вологда;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk

Несмотря на несомненные успехи, достигнутые в борьбе с некоторыми инфекционными заболеваниями, существует ряд инфекций, диагностика которых до сих пор затруднена. Так, к числу открытых в ушедшем XX столетии инфекционных заболеваний с доказанной нозологической самостоятельностью относится листериоз, возбудитель которого широко распространен в природе и вызывает острые инфекционные заболевания у людей и животных. Хотя листериоз и не является распространенной инфекцией, уступая таким заболеваниям, как сальмонеллез и кампилобактериоз по количеству выявленных случаев, но значительно превосходит их по тяжести клинического процесса и проценту летальных исходов.

Введение обязательных регламентированных требований санитарно-бактериологического контроля за обсемененностью пищевых продуктов патогенными штаммами листерий позволило обратить более пристальное внимание на проблему листериоза, тем самым позволяя получить реальную

картину распространенности этой инфекции во всех регионах России.

Для накопления и выделения *Listeria monocytogenes* в практических лабораториях в субъектах Российской Федерации в основном используют сухие коммерческие селективные питательные среды зарубежных производителей. Использование этих сред в России крайне ограничено по причине их высокой стоимости. В то же время становятся доступными питательные среды для культивирования, выделения и идентификации листерий отечественных производителей.

Материалы и методы. На базе лаборатории бактериальных и паразитарных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области» за последние 5 лет количество исследований пищевых продуктов на наличие *Listeria spp.* увеличилось в 1,5 раза. За этот период было выделено 337 штаммов листерий (166 штаммов *L. monocytogenes* и 171 штамм листерий других видов). При этом высеваемость увеличилась с 0,8 до 2,0%. Листерии находили в рыбе и рыбных пресервах, замороженных овощах и салатах, сырье для молочных производств, мороженом. Основная масса этих видов продукции представлена продуктами, готовыми к употреблению.

Культивирование листерий проводили на агаризованных селективно-диагностических питательных средах: PALCAM agar (HiMedia, Индия), Oxford agar (Oxoid, Великобритания), ПАЛ агар (Оболенск, Россия). Для дальнейшей характеристики и идентификации культуры пересевали на мясо-пептонный агар с 1% глюкозы (Оболенск, Россия), триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) (HiMedia, Индия), триптиказо-соевый агар (TSA) (HiMedia, Индия), мясо-пептонный бульон (МПБ) с 1% глюкозы (Оболенск, Россия), триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB) (HiMedia, Индия), триптиказо-соевый бульон (TSB) (HiMedia, Индия). Исследование культуральных свойств листериозных штаммов проводили согласно методам, представленным в ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*» и в Методических указаниях МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах».

Видовую идентификацию штаммов листерий осуществляли следующими методами: масс-спектрометрическим анализом с использованием технологии MALDI-TOF на масс-спектрометре Biotyper (Bruker, Германия) с автоматической программой Bruker Taxonomy; серотипирование культур в реакции агглютинации (АГ) со специфической листериозной сывороткой на *Listeria monocytogenes* (Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, Россия); серотипирование в реакции латекс-агглютинации (ЛАГ) на стекле с помощью «Латексной тест-системы *Listeria monocytogenes*» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия); ПЦР-анализ с использованием коммерческой тест-системы «*Listeria monocytogenes*-EFP» (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия); ПЦР-анализ с использованием экспериментальной тест-системы для родовой идентификации *Listeria spp.* (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия); ПЦР-анализ с использованием экспериментальных тест-систем для видовой идентификации шести видов листерий (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Результаты. Для культивирования и идентификации высеянными методами использовали 120 штаммов листерий, выделенных из пищевых продуктов и клинического материала. В ходе проведенных исследований установлено, что 112 штаммов, выделенных из пищевых продуктов, относятся к виду *L. monocytogenes*, 7 – к виду *L. innocua* и 1 – к виду *L. welshimerii*. Подтверждена идентификация штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из клинического материала пациента П. В настоящее время проводится дальнейшее изучение молекулярно-генетической характеристики штаммов *L. monocytogenes*.

Таким образом, на территории Вологодской области все штаммы листерий были выделены с одинаковой эффективностью при использовании как зарубежных питательных сред, так и отечественных.

Наибольшая степень достоверности (100%) межвидовой идентификации листерий была получена при использовании молекулярных методов (ПЦР). Идентификация патогенного вида *L. monocytogenes* была достигнута также при использовании технологии MALDI-TOF, в то время как другие виды листерий были идентифицированы в 90% случаев, что объясняется недостаточным наполнением базы данных спектров этих видов у разработчика программного обеспечения для масс-спектрометра.

Серологические методы типирования также хорошо себя зарекомендовали при идентификации *L. monocytogenes*, однако идентификация других видов листерий была осуществлена лишь на 5%.

Поскольку наибольшее этиологическое значение в развитии заболевания имеет вид *L. monocytogenes*, то любой из перечисленных методов идентификации заслуживает внимания и может быть использован в зависимости от уровня оснащённости бактериологической лаборатории.

Резистентность и молекулярно-эпидемиологическое исследование возбудителя туберкулеза, циркулирующего на территории РФ

Альварес Фигероа М.В.^{1,2}, Луданный Р.И.¹, Домотенко Л.В.³, Кравцова Т.А.¹, Попов С.А.⁴, Мокроусов И.В.⁵, Лобашова Г.П.², Шипулин Г.А.¹

¹ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва;

²7-я ТКБ ДЗ г. Москвы (в настоящее время МНПЦ БТ ДЗ г. Москвы);

³ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, п. Оболенск;

⁴ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова» Минздрава России, НИИ ФП, г. Москва;

⁵ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», г. Санкт-Петербург

Целью нашей работы было изучение клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis complex*, циркулирующих на территории РФ, путем определения частоты встречаемости и вариантов мутаций в их генах, ассоциированных

с развитием множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), а также их сопряжения с генотипами.

Материалы и методы. В исследование включен 151 штамм *M. tuberculosis* по принципу «один больной – один клинический изолят», отобранные случайным образом от больных туберкулезом в стационарах Московского региона. Генетический анализ локусов генов *rpoB*, *katG* и промотора гена *inhA*, мутации в которых ассоциированы с устойчивостью к рифампицину и изониазиду (МЛУ), проводили методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Генотипирование проводили методом сполиготипирования. Для классификации полученных профилей сполиготипирования использовали международную компьютерную базу данных SITVITWEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/). Фенотипическую чувствительность определяли методом минимальных ингибирующих концентраций с помощью набора реагентов Sensititre®MYCOTB TREK Diagnostic Systems (Thermo Fisher Scientific). Для статистической обработки результатов исследования использовали критерий χ^2 Пирсона.

Результаты. По результатам сполиготипирования все клинические изоляты были разделены на 2 группы сполиготипов: Beijing (71,5%, $n = 108$) и другие сполиготипы (non-Beijing, 28,5%, $n = 43$). У сполиготипа Beijing мутация Ser 531>Leu в *rpoB* гене встречалась в 70,4% случаев, тогда как у штаммов non-Beijing – только в 18,6%. Другие варианты мутаций в этом гене у сполиготипа Beijing встречались только в 3,7% случаях, тогда как у non-Beijing – в 30,2%. Ген дикого типа наблюдался у сполиготипа Beijing в 25,9% случаев, а у non-Beijing – в 51,2%. Для всех подгрупп получены статистически достоверные различия ($\chi^2 = 30$, $p < 0,0001$).

При проведении подобного анализа для комбинаций гена *katG* и промотора гена *inhA* для сполиготипов Beijing и non-Beijing соответственно получены статистически значимые различия: в случае одновременного наличия в них мутаций – в 13,9% и в 34,9% случаев ($\chi^2 = 7,59$, $p = 0,0059$) или дикого типа – в 20,4% и в 39,5% случаев ($\chi^2 = 4,49$, $p = 0,0341$), а также при наличии генетических изменений только в гене *katG* – 62% и 20,9% ($\chi^2 = 17,54$, $p < 0,0001$). Мутации только в промоторе гена *inhA* встречались в небольшой доле обоих генотипов – 3,7% и 4,7%, в этом случае статистически достоверных отличий не выявлено.

У сполиготипа Beijing в гене *rpoB* достоверно чаще выявлялись «сильные» мутации, характеризующиеся высокой степенью ассоциации с резистентным фенотипом: Asp 516>Val и His 526>Tyr (обе $\chi^2 = 7,663$, $p = 0,0056$), а также Ser 531>Leu ($\chi^2 = 29,489$, $p < 0,0001$). Тогда как у сполиготипов non-Beijing чаще встречался дикий тип ($\chi^2 = 8,831$, $p = 0,003$).

Выводы. Проведенное молекулярно-генетическое исследование позволило выявить ряд особенностей у циркулирующей на территории РФ популяции *M. tuberculosis*. Эти сведения могут быть полезны для эпидемиологического анализа, а также при интерпретации результатов определения чувствительности *M. tuberculosis* complex к противотуберкулезным препаратам, полученным молекулярно-генетическими методами.

Выявление нетуберкулезных микобактерий в противотуберкулезных учреждениях Сибири и их лекарственная устойчивость

Альховик О.И., Евдокимова Л.С.

ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Новосибирск

В молекулярно-биологической лаборатории ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России в период 2013–2017 гг. методом ПЦР-гибридизации на стрип-полосках (Genotype Mycobacterium CM/AS Hain Lifescience) было генотипировано 288 изолятов нетуберкулезных микобактерий, выделенных от пациентов противотуберкулезных учреждений Новосибирской, Томской, Кемеровской областей, Алтайского края и Республики Саха-Якутия. Видовой состав характеризовался следующим образом: *M. peregrinum* – 12 изолятов, *M. fortuitum* – 65, *M. gordonae* – 43, *M. intracellulare* – 50, *M. abscessus* – 40, *M. kansasii* – 28, *M. avium* – 30, *M. peregrinum* – 12, *M. scrofulaceum* – 3, *M. xenopi* – 6, *M. interjectum* – 2 изолята.

Изучена частота встречаемости различных видов нетуберкулезных микобактерий в период с 2013 по 2017 гг. В динамике встречаемости различных видов нетуберкулезных микобактерий количество быстрорастущих микроорганизмов значительно снизилось, так, количество *M. abscessus* снизилось с 15% до 6,8%, *M. fortuitum* – с 35% до 16%, при этом количество *M. intracellulare* возросло втрое – с 10 до 34,2%, встречаемость *M. avium* в среднем составила 11%, а *M. kansasii* возросло с 6,8% до 8,2%, то есть складывается устойчивая тенденция к превалированию медленно растущих видов нетуберкулезных микобактерий.

Лекарственная устойчивость определялась методом минимальных ингибирующих концентраций антибактериальных и противотуберкулезных препаратов с применением наборов TREK Diagnostic Systems. Наименьшие показатели минимальной ингибирующей концентрации амикацина наблюдали по отношению к быстрорастущим штаммам. Для большинства быстрорастущих нетуберкулезных микобактерий показатели минимальной ингибирующей концентрации цефтриаксона, цефепима, цефокситина были максимальными, что позволило предположить неэффективность этих препаратов в отношении нетуберкулезных микобактерий. Рост медленно растущих нетуберкулезных микобактерий подавляли низкие минимальные ингибирующие концентрации кларитромицина, линезолида и амикацина, что свидетельствует об их эффективности. Рост *M. avium* не подавлялся доксициклином, этамбутолом, изониазидом, линезолидом, умеренная чувствительность наблюдалась к амикацину, кларитромицину и моксифлоксацину, таким образом, эти изоляты можно считать наиболее резистентными.

Такие препараты, как амикацин, кларитромицин, линезолид оказались наиболее эффективными, а этамбутол, стрептомицин, триметоприм/сульфаметоксазол – наименее эффективными *in vitro*.

Фунгицидная активность метаболитов штаммов *Bacillus thuringiensis* относительно патогенных грибов рода *Candida*

Андреева И.С.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"», р.п. Кольцово Новосибирской области

Кандидоз – микотическая инфекция, вызываемая дрожжеподобными грибами рода *Candida*, входящего в семейство *Cryptococcaceae*. Грибы этого рода относятся к условно-патогенным микроорганизмам с высоким уровнем носительства, способным поражать кожные покровы, желудочно-кишечный тракт, вызывать легочные поражения. Возникновение побочных эффектов при длительном применении синтетических антимикотических средств, формирование резистентности у патогенов является причиной активного поиска новых соединений с антифунгальной активностью. В частности, известны штаммы рода *Bacillus*, проявляющие антагонистическую активность в отношении дрожжеподобных грибов *Candida albicans* [Орлова М.В. и др., 2003; Акуганов Г.Э. и др., 2013].

В настоящей работе показана высокая антимикотическая штаммов *Bt ssp. galleriae* (H5a5b), *Bt ssp. kurstaki* (H3abc) относительно типового штамма *C. albicans* и трех клинических изолятов рода *Candida*, выделенных из мочи, рото- и носоглотки больного, страдающего генерализованной формой кандидоза. При совместном культивировании в жидкой среде штаммов кандид и штаммов *Bt* титр жизнеспособных клеток патогенов, в сравнении с контролем, снижался в среднем на три порядка. При использовании диффузионного метода зоны лизиса всех четырех исследуемых культур кандид превышали 45 мм. Полученные данные являются хорошей предпосылкой для разработки на основе метаболитов штаммов *Bacillus thuringiensis* антимикотических препаратов.

Исследование компонентов культуральной жидкости штаммов *Bacillus thuringiensis*, проявляющих активность в отношении вирусов гриппа с пандемическим потенциалом

Андреева И.С.¹, Закабунин А.И.²

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"», Кольцово;

²Институт химической биологии и функциональной медицины СО РАН, г. Новосибирск

В предварительных работах авторами показано, что внеклеточные метаболиты КЖ штаммов бактерий вида *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) при низкой токсичности эффективно подавляют размножение вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) и вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) на культуре ткани MDCK [Андреева И.С. и др., 2005]. Учитывая данные о противовирусной активности бациллярной РНКазы биназы [Shar Mahmud R., Ilinsaya O.N., 2013], мы исследовали внеклеточные РНКазы типовых штаммов

Bt ssp. galleriae (H5a5b), *Bt ssp. kurstaki* (H3abc), *Bt ssp. finitimus* (H2), а также штаммов *Bt* с неопределенным серотипом из состава Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Среди пяти испытанных питательных сред наибольший выход ферментов в среду происходил при культивировании на среде ПДГГ состава (г/л): пептон – 9,27, дрожжевой экстракт – 5,0, NaCl – 3,0, глюкоза – 0,2, глицерин – 5,0. На этой среде высокая и постоянная концентрация ферментов (порядка 370–400 е.а./мл) сохранялась до 2 сут ферментации при 30 или 37°C. Зимографическим анализом регулярно выявлялось до 8 полос гидролиза высокополимерной РНК дрожжей, использованной в качестве субстрата. Качественный состав РНКаз практически не изменялся в процессе ферментации, изменения во времени носили количественный характер. Набор РНКаз (от 15 до 75 кДа) у всех исследованных штаммов *Bt* был практически одинаков. Состав среды культивирования влиял на представительство обнаруживаемых зимографически ферментов.

Предложены методы обнаружения, концентрирования и выделения РНКаз штаммов *Bt* для получения ферментов в препаративных количествах.

Потенциальная опасность бактерий атмосферных аэрозолей для здоровья человека

Андреева И.С.¹, Сафатов А.С.¹, Терновой В.А.¹, Буряк Г.А.¹, Емельянова Е.К.^{1,2}, Прманова Э.П.^{1,2}

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"», Кольцово;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск

Атмосферные аэрозоли – универсальный переносчик микроорганизмов между различными регионами Земли, в том числе бактерий, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека.

Целью настоящей работы являлось выявление в атмосфере на высотах 500–7000 м потенциально опасных бактерий, образующих эндоспоры. Пробы атмосферного воздуха отбирали с октября по декабрь 2016 г. над лесным массивом в районе Обского водохранилища с использованием самолета-лаборатории в импинджеры с раствором Хенкса и высевали их на соответствующие жидкие и агаризованные среды. Высевы инкубировали при 28–30 и 6–10°C в течение 14 сут.

Выделено 225 бактериальных культур, из которых 62 образовывали эндоспоры с общей численностью, достигающей в отдельных пробах нескольких сотен в 1 м³, что довольно типично для этого региона. Идентификацию выделенных бактерий проводили при анализе 16sРНК и изучении фенотипических признаков. Спорообразующие бактерии были отнесены к родам *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* и др. Среди определенных видов обнаружены условно патогенные бациллы. Кроме того, 6 штаммов, выделенных из проб атмосферных аэрозолей, взятых на разных высотах, были отнесены к патогенному виду бактерии *Bacillus cereus*, способной при определенных условиях явиться причиной пищевых отравлений и других заболеваний. Выявлена высокая резистентность

бацилл к антибиотикам: к левомицетину (98% изолятов), группе пенициллинов (30%); часть штаммов были полирезистентными, проявляя устойчивость к 5–8 антибиотикам.

Исследование ферментативной активности микробных изолятов показало, что протеазами обладали 19 культур; амилазная активность присутствовала у 12 культур; высокое содержание фосфатаз подтверждено для 20 культур; нуклеазами обладали 4 культуры; липазы обнаружены в 14 культурах. Протеолитическая, липазная и фосфатазная активности бактерий, выявленных в атмосферных аэрозолях, являются косвенными признаками патогенности, что позволяет штаммы, продуцирующие эти ферменты, в некоторой мере также относить к потенциально опасным микроорганизмам, способным вызвать заболевание человека.

Тест-система для ускоренного выполнения санитарно-бактериологического анализа воды

Артемова Т.З., Загайнова А.В., Гипп Е.К., Максимкина Т.Н.

ФГБУ «НИИ ЭЧ И ГОС им. А.Н. Сысина», г. Москва

Тест-системы IDEXX производства фирмы IDEXX Laboratories, Inc (США) предназначены для обнаружения и идентификации санитарно-показательных микроорганизмов в пробах воды. Эти тест-системы основаны на использовании хромогенных питательных сред и реагентов в соответствии с методикой, разработанной фирмой-изготовителем.

Метод IDEXX не уступает референтным методам исследования воды, которые применяются на территории РФ и в международной практике. Сравнительная оценка посевов показала сопоставимость полученных результатов как при исследовании загрязненной воды с естественными микробиоценозом, так и воды модельных водоемов, контаминированных суточными культурами тест-микроорганизмов. Метод позволяет сократить время проведения анализа за счет исключения проведения биохимических реакций (оксидазная активность, ферментация углеводов, образование индола и др.), необходимых для определения видовых признаков микроорганизмов, и получить окончательный результат анализа через 24 ч.

Характеристика антибиотикорезистентных клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в Ярославле в 2016–2017 гг.

Асташкин Е.И.¹, Лев А.И.¹, Новикова Т.С.¹, Карцев Н.Н.¹, Федюкина Г.Н.¹, Ершова М.Г.², Полетаева Е.Д.², Фурсова Н.К.¹, Шепелин А.П.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk;

²ГУЗ ЯО «Инфекционная клиническая больница №1», г. Ярославль

Цель – изучение чувствительности к антибактериальным препаратам (АП), внутривидовое типирование и идентификация генетических детерминант антибиотикорезистентно-

сти клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в 12 отделениях лечебных учреждений Ярославля в декабре 2016 – марте 2017 гг.

Использованы питательные среды ГРМ и Мюллер-Хинтон II (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия). Бактерии идентифицировали на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Чувствительность определяли к 4 функциональным классам АП: бета-лактамам, фторхинолонам, аминогликозидам и тетрациклинам. Гены бета-лактамаз (*blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaOXA-48*, *blaNDM*, *blaKPC*, *blaVIM*) и интегроны классов 1 и 2 детектировали методом ПЦР. Внутривидовое генотипирование изолятов осуществляли методом RAPD-PCR со «случайными» праймерами OPA 11, Wil 2 и 1247.

Антибиотикорезистентные клинические изоляты *K. pneumoniae* ($n = 43$), выделенные из дыхательной системы (58% изолятов) и хирургических ран (42%), были устойчивы к ампициллину (100%), амоксициллину/клавуланату (100%), цефуроксиму (100%), цефотаксиму (100%), пиперациллину/тазобактаму (100%), имипенему (40%), меропенему (42%), левофлоксацину (92%), тигециклину (49%), амикацину (5%). При этом 10% изолятов были устойчивы к одному функциональному классу АП, 46% изолятов – к двум классам, а 44% изолятов – к трем-четырем классам, т.е. являлись полирезистентными (multi-drug resistant, MDR) патогенами, по международной классификации. При изучении молекулярных механизмов резистентности было показано, что практически все изучаемые изоляты имели гены бета-лактамаз: TEM-типа (100%), CTX-M-типа (100%), SHV-типа (98%), OXA-48-типа (95%). Гены карбапенемаз NDM-, KPC- и VIM-типов не обнаружены. В геномах 21% изолятов выявлены интегроны класса 1, а интегронов класса 2 не обнаружено. В одном из изолятов (*K. pneumoniae* YA1666) идентифицированы одновременно два интегрона класса 1 с двумя разными наборами генных кассет: *aadB-aadA1* и *dfrA1-orfC*. Генотипирование выявило 8 RAPD-генотипов, среди которых преобладающим в декабре-январе являлся А-генотип ($n = 12$), а в феврале-марте – D-генотип ($n = 16$).

Таким образом, среди изученных клинических изолятов *K. pneumoniae* около половины являются полирезистентными (MDR) патогенами, что ассоциировано с наличием у них генов бета-лактамаз и интегронов класса 1, в том числе эпидемически значимых цефалоспориноз CTX-M-типа и карбапенемаз OXA-48-типа, что отражает современную тенденцию по распространению MDR возбудителей во всем мире.

Активность формирования биопленки *in vivo* штаммом чумного микроба из Тувы

Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Воронова Г.А.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск

Чумной микроб, как и другие патогенные микроорганизмы, формирует биопленку, что обеспечивает его выживание, сохранение и распространение.

Цель работы – изучение в эксперименте особенностей формирования биопленки в организме блох референтным для Тувинского природного очага чумы штаммом И-2638,

имеющим, как и все типичные тувинские штаммы, четыре плазмиды (pYT, pYV, pYP, pTP 33).

В эксперименте использованы блохи трех видов, различающихся по векторной активности (*Xenopsylla cheopis* – высокоактивный, *Citellophilus tesquorum* – активный, *Frontopsylla luculenta* – малоактивный переносчики). Для анализа особенностей формирования биопленки учитывали долю эктопаразитов с бактериальными «глыбками» и блоками за каждую подкормку. Влияние фактора «вид блохи» на изучаемый показатель оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, различия между двумя группами по средним показателям – с применением критерия Стьюдента.

У *X. cheopis* формирование блоков началось при первой, а «глыбок» – второй подкормках. У *C. tesquorum*, напротив, «глыбки» появились при первой подкормке, а блоки – после пятой. *F. luculenta* с «глыбками» отмечали с первой подкормки. В конце опыта выявили одну заблокированную блоху (на 29-е сутки). В среднем за подкормку с биопленками регистрировали: 14,3 ± 2,85% *X. cheopis* (11,3 ± 2,32% с блоками и 3,1 ± 0,73% с «глыбками»), 46,8 ± 5,35% *C. tesquorum* (2,4 ± 1,00% с блоками, 44,4 ± 4,64 % с «глыбками»), 19,3 ± 1,22% *F. luculenta* (18,0 ± 1,78% с «глыбками»). Однофакторный дисперсионный анализ показал, что фактор «вид блохи» оказывает значительное влияние на формирование биопленки ($F = 23,94$; $p < 0,001$). По доле особей с блоком от числа блох, взятых в опыт, *F. luculenta* значительно уступали как *X. cheopis* ($t = 11,29$; $p < 0,001$), так и *C. tesquorum* ($t = 3,75$; $p < 0,001$). При этом у *X. cheopis* блоки формировались достоверно чаще, чем у *C. tesquorum* ($t = 9,64$; $p < 0,001$). К концу опыта количество содержащих биопленку чумного микроба особей среди *X. cheopis* и *F. luculenta* по сравнению с максимальным зарегистрированным показателем снизилось в два и более раза, составив 12,5 и 9,4% соответственно, а среди *C. tesquorum* оставалось стабильно высоким (более 50% питавшихся особей). Таким образом, наиболее активно штамм И-2638 формировал биопленку у блох *C. tesquorum*, происходящих с территории Тувинского природного очага чумы, что, предположительно, может являться решающим фактором для долговременной энзоотичной персистенции *Y. pestis*.

Способ бесприборной визуализации результатов изотермической амплификации ДНК возбудителя сибирской язвы

Баранова Е.В., Щит И.Ю., Панферцев Е.А., Мочалов В.В., Федюкина Г.Н., Соловьев П.В., Горбатов А.А., Миронова Р.И., Бикетов С.Ф.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk

Целью работы являлась разработка способа бесприборной визуализации продуктов петлевой изотермической амплификации (LAMP) ДНК возбудителя сибирской язвы. Методический подход состоит в проведении LAMP с биотинилированными праймерами с последующей визуализацией

продуктов амплификации с помощью стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена.

В работе использовали штаммы *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, полученные из коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ – «ГКПМ-Оболensk». Для амплификации фрагментов генов *pag* (pX01), *cap* (pX02), *dhp73.017* и *dhp73.019* (хромосома) *B. anthracis* использовали несколько наборов праймеров. Для получения биотинилированных амплификатов в процессе амплификации 5'-концы FIP и VIP праймеров каждого набора были биотинилированы при синтезе. После завершения реакции амплификации по 2 мкл смеси из реакционной пробирки наносили на нитроцеллюлозную мембрану в виде точек и просушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем мембрану помещали в емкость с блокировочным раствором и инкубировали в течение 15 мин. Далее мембрану дважды промывали отмывочным раствором в течение 1 мин, помещали в раствор конъюгата (стрептавидин-пероксидаза в рабочем разведении) на 15 мин. Для визуализации LAMP-продукта мембрану после отмывки инкубировали в течение 2–5 мин в свежеприготовленном растворе субстрата до появления видимых пятен. LAMP-амплификаты были детектированы только при наличии гена-мишени в исследуемых штаммах. Установлена 100% воспроизводимость и чувствительность метода с набором праймеров *capBA194*, *pagBA272*, *chBA20*.

Разработанный вариант имеет преимущества в сравнении с другими способами регистрации продуктов LAMP, поскольку сокращает время анализа и не требует сложного оборудования. Проведение данного метода визуализации LAMP-продуктов возможно в диапазоне температуры от 20 до 40°C. Результаты апробации разработанного способа бесприборной детекции в формате дот-блота на ДНК мишенях *B. anthracis* свидетельствуют о значительном потенциале его применения в слабо оснащенных лабораториях и в полевых условиях для экстренной индикации и идентификации возбудителей ООИ.

Образование биопленки возбудителем респираторного микоплазмоза *Mycoplasma pneumoniae*

Бархатова О.И., Андриевская С.Г., Алексеева Н.В., Жуховицкий В.Г.

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», г. Москва

Из всех известных видов микоплазм человека *Mycoplasma pneumoniae* (*Mp*) является наиболее патогенной. Она вызывает различные воспалительные заболевания верхних дыхательных путей, а в тяжелых случаях – атипичную пневмонию. Эта микоплазма способна к цитадсорбции на клетках респираторного эпителия человека и адсорбции и росту в виде пленки на абиотических поверхностях. Показано, что популяция *Mp* состоит из клеток с различными адгезивными потенциальными. Лишь часть популяции способна прикрепляться к поверхности культурального сосуда и в дальнейшем раз-

растаться в виде довольно плотной и прочной пленки. **Целью нашей работы** явилось изучение структуры этого слоя клеток с позиции оценки его как потенциальной биопленки.

Материалы и методы. В работе использовали культуры *Mycoplasma pneumoniae* (Mp) Fh, *Mycoplasma hominis* (Mh) H-34 и *Ureaplasma urealyticum* (Uu) из коллекции Лаборатории микоплазм и Л-форм бактерии ФГБУ «НИЦЭМ» им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России. Культуры выращивали на коммерческой среде BD PPLO, бульоне и агаре с добавлением нормальной сыворотки лошади, экстракта пекарских дрожжей и, в зависимости от вида микроорганизма, глюкозы, аргинина и мочевины. Mp, выросшую на поверхности стекла сосуда, 2–3 раза перепассировали «со стекла на стекло» для селекции популяции, стабильно растущей на абиотической поверхности. Для оценки интенсивности формирования пленки Mp на твердой поверхности использовали полистироловые микротитровальные планшеты. Выросший в лунках слой микоплазмы окрашивали раствором кристалл-виолета, далее экстрагировали краситель 96° этиловым спиртом и измеряли оптическую плотность окрашенного спирта на фотометре IEMS, Reader MF (Labsystems, Sweden) при длине волны 540 нм. Ультраструктурную организацию клеток микоплазм изучали методом сканирующей электронной микроскопии. Слой культуры Mp на поверхности покровных стекол фиксировали в 10% растворе формалина и напыляли на него слой золота толщиной 5 нм. Модуль для напыления SPI-MODULE Sputum Coater (SPI Supplies, USA). Полученные препараты анализировали с помощью двулучевого ионно-электронного сканирующего микроскопа Quanta 200/3D (FEI Company USA) в условиях высокого вакуума, при ускоряющем напряжении 5,0–7,5 кВ и рабочем увеличении от 400X до 40000X.

Результаты. Оценка динамики формирования пленки Mp на поверхности лунок полистиролового планшета показала, что наибольшая интенсивность роста культуры наблюдалась на 2-е сутки инкубации планшета при 37°C. На 3-и сутки отмечалось некоторое снижение плотности пленки, что, по-видимому, связано с отрывом фрагментов слоя и переходом их в бульонную среду. В отличие от MP, Mh и Uu не давали роста на поверхности лунок планшета, т.к. оптическая плотность в опытных лунках была практически идентична результатам в контрольных с чистой питательной средой. Ультраструктурное изучение клеток Mp, образующих пленку на поверхности стекла, показало, что при увеличении 400x пленка представляла собой сетчатый слой, в котором были видны плотно упакованные, но с явно различимыми промежутками отдельные группы клеток. При увеличении 6000x были выявлены клетки микоплазмы, которые плотно прилегали друг к другу и были организованы в многослойную, значительную по размеру (10–80 мкм), четко ограниченную структуру. Исследование этих структур при увеличении 12 000x показало, что в их составе наблюдаются микроорганизмы шарообразной формы размером около 300 нм, которые объединены между собой веществом средней электронной плотности, местами покрывающим их полностью. На поверхности этих структур просматривались отверстия по типу пор. Более высокое разрешение прибора (40 000x) позволило выявить выраженный слой экзоматрикса и систему пор,

характерных для структуры биопленок. Морфология обнаруженных образований была полностью идентична структуре биопленок, ранее описанных у других микроорганизмов. Все выявленные нами морфологические признаки дают возможность утверждать, что Mp растет *in vitro* в виде биопленки. Сорбционные свойства Mp как *in vitro*, так и *in vivo* связывают с мембранными адгезинами гликопротеиновой природы (P1, P2 и др.), поэтому вполне логично предположить, что Mp растет в виде биопленки и на эпителиальных клетках респираторного тракта человека. Для микоплазмоза, вызываемого Mp, характерна генерализация инфекционного процесса и длительная персистенция возбудителя в организме человека, что, возможно, в определенной степени зависит от существования возбудителя в виде биопленки, устойчивой к действию антибиотиков и защищенной от антибактериальных факторов макроорганизма. Описанный нами феномен может иметь большое значение не только в понимании роли и поведения Mp при респираторном микоплазмозе, но и при разработке методов лечения этого заболевания.

Особенности микрофлоры конъюнктивальной полости у детей с блефароконъюнктивитами

Баязитова Л.Т.^{1,2}, Тюпкина О.Ф.¹, Чазова Т.А.¹, Тюрин Ю.А.^{1,2}, Лисовская С.А.^{1,2}

¹ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии», г. Казань;

²ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет», г. Казань

Конъюнктивиты и блефароконъюнктивиты являются распространенной патологией среди всех воспалительных заболеваний глаз (30,3–42,8%). В последнее время наблюдается увеличение доли затяжных и хронических форм, рост антибиотикорезистентности этиологически значимой микрофлоры и активизация грибковой флоры (как следствие бесконтрольного и длительного применения антибиотиков).

Цель исследования – изучить микробиоту конъюнктивальной полости у пациентов с блефароконъюнктивитами, оценить уровень их чувствительности к АМП.

Материалы и методы. Биоматериал высевали на Columbia agar Base с 5% крови, желточно-солевой агар, Эндо и Сабуро. Идентификацию микроорганизмов проводили на основании морфологических, культуральных свойств согласно нормативным документам. Определение чувствительности к антимикробным препаратам осуществляли согласно Клиническим рекомендациям (EUCAST, 2015 г.).

Результаты. Проведено микробиологическое обследование 82 детей с блефароконъюнктивитами. Лидирующим возбудителем является *Staphylococcus spp.* (74,3%): в том числе коагулазонегативные стафилококки (63,4%); *Staphylococcus aureus* (10,9%). У 7 пациентов с конъюнктивальной полости высеяны пневмококки, при этом у 4 детей *Streptococcus pneumoniae* колонизировали и носоглотку. У 2 пациентов обнаружены энтеробактерии. У 2 пациентов зарегистрирован ассоциативный рост грибов рода *Candida* с грампозитивными бактериями. Анализ антибиотикочувствитель-

ности стафилококковой микрофлоры показал: 95% штаммов чувствительны к фузидовой кислоте; 87,2% – к левофлоксацину; 72,5% – к ципрофлоксацину; 70,5% – к хлорамфениколу. Высокую антистафилококковую активность проявляют гентамицин (78,4%) и тобрамицин (70,9%). Тетрациклин и эритромицин наименее активны в отношении *Staphylococcus spp.*: 52,4% штаммов чувствительны к тетрациклину, 29,7% штаммов чувствительны к эритромицину.

Выводы. В этиологической структуре возбудителей блефароконъюнктивитов у детей доминируют *Staphylococcus spp.*, в особенности коагулазонегативные стафилококки. Высокоактивными антистафилококковыми препаратами являются фузидовая кислота, фторхинолоны и аминогликозиды. У пациентов с патологией ЛОР-органов наблюдается персистенция бактерий в конъюнктивальной полости и в носоглотке, что требует санации смежных биотопов. Для проведения адекватной этиотропной терапии необходимо своевременное микробиологическое обследование пациентов с блефароконъюнктивитами.

Мониторинг циркуляции коагулазонегативных стафилококков в детском стационаре

Беляева Е.В.¹, Борискина Е.В.¹, Ермолина Г.Б.¹, Носова Т.В.², Белова И.В.¹, Точилина А.Г.¹, Соловьева И.В.¹

¹ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород; ²ГБУЗ НО «Детская городская клиническая больница №1 Приокского района г. Нижнего Новгорода», г. Нижний Новгород

Формирование микробиоценоза новорожденных, госпитализированных в стационар, происходит с участием нозокомиальной флоры, которая может вызывать различные инфекционно-воспалительные патологии. В клиническом материале от новорожденных в ЛПУ преобладают коагулазонегативные стафилококки, что было показано для детских стационаров гг. Москвы, Н.Новгорода, Перми, Оренбурга в 2008–2015 гг.

В нашей работе были исследованы 263 штамма стафилококков, выделенных в 2016 г. из глаз, ушей, зева, носа, кожных складок и пупочных ранок детей периода новорожденности при поступлении в стационар и в ходе лечения, а также из крови и с интубационных трубок, кроме того – из смывов с рук медперсонала и с манипуляционных столиков.

Идентификацию штаммов проводили методом времяпролетной MALDI-TOF масс-спектрометрии на масс-спектрометре Autoflex speed (Bruker Daltonics, Германия) с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0. О достоверности идентификации судили по значению коэффициента совпадения Score values (2,000–3,000 – идентификация до вида, 1,999–1,700 – идентификация до рода) и значению категорий (А – достоверная идентификация до вида, В – достоверная идентификация до рода, С – недостоверный результат).

Все исследованные штаммы были идентифицированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии до вида с показателем Score больше 2,0, категория А. Среди изолятов из пупочной ранки и из очагов поражения на коже (80 штаммов) преобладали *S. epidermidis* (56,25%) и *S. haemolyticus* (30,0%), минорными представителями были *S. warneri* (8,75%) и *S. hominis* (5,0%). Аналогично при исследовании отделяемого глаз (46 штаммов) были выявлены *S. epidermidis* (67,39%), *S. haemolyticus* (26,09%) и *S. warneri* (6,52%). Однако в отделяемом верхних дыхательных путей (88 штаммов) и смывах с интубационных трубок (10 штаммов) преобладали *S. haemolyticus* (48,86% и 60,0% соответственно), реже встречались *S. epidermidis* (37,50% и 30,0% соответственно), *S. warneri* (10,23% и 10,0% соответственно), а *S. hominis* – только в отделяемом верхних дыхательных путей в 3,41% случаев. Из крови новорожденных (31 штамм) высевались в равной степени *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* (38,71%), в минорных количествах – *S. warneri* (12,90%) и *S. hominis* (9,68%). В смывах из внешней среды (8 штаммов) доминировали *S. haemolyticus* (62,50%), значительно реже встречались *S. hominis* (25,0%) и *S. epidermidis* (12,50%).

Таким образом, циркуляция штаммов *S. haemolyticus* и *S. epidermidis* в стационаре представляет наибольшую угрозу для новорожденных.

Этиология инфекции кожи и мягких тканей. Антибиотикорезистентность микробиоты у больных отделения гнойной хирургии

Белятич Л.И., Клюева Е.В.

СПб ГБУЗ «Городская больница №14», г. Санкт-Петербург

Микробиологические исследования внутригоспитальной инфекции отчетливо показывали, что существует потребность в коррекции и совершенствовании антибиотикопрофилактики и антибиотикотерапии хирургической инфекции как стационарных больных, так и находившихся на амбулаторном лечении.

Цель. Изучение этиологической структуры микробиоты при инфекциях кожи и мягких тканей и ее устойчивости к антимикробным препаратам в гнойно-раневом отделяемом.

Материалы и методы. Материал исследования: раневое отделяемое. Исследовано 4580 проб раневого отделяемого у больных, проходивших лечение в хирургических отделениях стационара, отделении анестезиологии и реанимации и центре амбулаторной хирургии. Больные с флегмонами составили 66,7%, с маститами – 5,5%, с бурситами, гнойными артритами – 9%, с панарициями и пандактилитами – 7,6%, с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей – 4,4%, с гидроденитами – 1,7%, с инфицированными ранами – 3,3%, прочие – 1,8%. Определение чувствительности выделенных чистых культур к антибактериальным препаратам проводилось диско-диффузным методом в агаре Мюллер–Хинтон.

Результаты. Микробный пейзаж в стационаре распределен следующим образом: 80,3% составляет грамположи-

тельная микробиота, на долю грамотрицательной приходится 19,3% и 0,4% на грибы рода *Candida*.

Из грамположительной микробиоты выделялись: золотистый стафилококк (62%), остальные виды стафилококков (12%), энтерококки (12%), пиогенный стрептококк (6%). 8% стафилококков были оксациллинрезистентными (ORS).

Из грамотрицательной микробиоты чаще выделялись *E. coli* (19%), *Enterobacter spp.* (18%) и *Proteus spp.* (15%), причем *Proteus mirabilis* – более половины из группы протеев. Удельный вес других грамотрицательных микроорганизмов составил: *Klebsiella spp.* – 11%, *Acinetobacter spp.* – 7%, *Pseudomonas aeruginosa* – 4%. Тогда как в реанимационном отделении в хирургических ранах чаще выделялись изоляты *Klebsiella spp.* и *Acinetobacter spp.*

Устойчивость бактерий к β -лактамам антибиотикам является актуальной проблемой в стране, в том числе и в нашем стационаре.

К цефалоспорином III поколения были устойчивы 40% изолятов *Klebsiella spp.*, 38% изолятов *Enterobacter spp.* и 11% изолятов *E. coli*.

Наибольшую активность в отношении энтеробактерий проявляли имипенем, цефоперазон/сульбактам и амикацин.

Наибольшую устойчивость к антимикробным препаратам среди энтеробактерий в стационаре проявляли штаммы *Klebsiella spp.*

К амикацину устойчивы 46% изолятов клебсиелл, к имипенему – 35%, к цефоперазону/сульбактаму – 33% изолятов клебсиелл.

Штамм *Klebsiella pneumoniae*, выделенный в стационаре, был устойчив к имипенему (51%), цефоперазону/сульбактаму (49%). Штамм *Klebsiella pneumoniae* из реанимационного отделения был резистентен к имипенему, цефоперазону/сульбактаму и обладал полирезистентностью к фторхинолонам и аминогликозидам. Культура проявляла чувствительность к тигециклину, колистину и фосфомицину.

Выводы.

1. Устойчивость к цефалоспорином III поколения и карбапенемам является маркером полирезистентности энтеробактерий.

2. Мониторинг антибиотикорезистентности микроорганизмов до начала лечения больного и в динамике является необходимым условием эффективности лечения больных.

3. Недопустимо использовать карбапенемы в качестве стартовой эмпирической терапии, так как это обеспечивает селекцию штаммов энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы.

4. Для сохранения ряда антибиотиков резерва наиболее целесообразна эмпирическая терапия двумя антибиотиками широкого спектра действия и экспресс-диагностика возбудителя.

5. В эпидемиологическом отношении необходимо учитывать, что источником гнойной инфекции является не только больной с гнойно-воспалительными заболеваниями, но и бактерионоситель (персонал).

6. Необходимо разделить потоки больных с хирургической инфекцией разной этиологии.

Новые подходы к иммобилизации пробиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus* наноструктурированными материалами на основе поливинилпирролидона

Березина О.Я., Маркова Н.П., Сидорова Н.А., Семенов А.В.

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск

Для оптимизации технологии получения запасных и физиологически активных веществ пробиотическими культурами разрабатываются способы, позволяющие не только закрепить, но и существенно увеличить положительное действие молочнокислых бактерий с учетом их пролонгирующего эффекта на макроорганизм. Одним из таких способов можно считать технологию иммобилизации, внедрение которой в практику получения эффективных штаммов позволяет существенно стабилизировать функции пробиотических микроорганизмов, в основном, за счет комплекса механизмов активации физиологических и биохимических реакций микробных клеток. В качестве носителей для иммобилизации применяются разнообразные природные органические и неорганические сополимеры, что объясняется их доступностью и наличием реакционно-способных функциональных групп. Положительные свойства носителей усиливаются при трансформации их в нановолокна, которые имеют высокую удельную площадь поверхности при небольшом диаметре. Методом электроспиннинга получены нанонити поливинилпирролидона (PVP) или 1-этенил-2-пирролидоинового гомополимера (С₆H₉NO). Объектом для иммобилизации служила суточная культура пробиотического штамма *Lactobacillus acidophilus* 317/402 Ер. п. v. «НАРИНЭ ААА» в составе пробиотического препарата «Наринэ». В эксперименте микроорганизмы инокулировали в питательную среду MRS (среда de Man, Rogosa, Sharp) с различными вариантами PVP и инкубировали в термостате при 37°C 24 ч. Результат иммобилизации оценивали по состоянию и морфологии клеток, изменению скорости роста, pH и динамике окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) среды. В результате проведенных наблюдений установлено, что присутствие PVP сказывается на поведении клеток: они начинают объединяться в единый матрикс и формируют биопленки. Через 6 ч эксперимента устанавливается стойкое снижение pH среды, которое соответствует фазе логарифмического роста бактерий и увеличению ОВП. В соответствии с полученными результатами нанонити PVP можно считать перспективным носителем для оптимизации технологии иммобилизации пробиотических культур.

Сравнительная характеристика чувствительности автоматической системы ALIFAX и прямого метода посева, используемых для скрининга бактериурии

Бирюков В.В., Пискарева О.В., Осипова Ю.А., Гусева Т.М., Евдокимова О.В.

ГБУ РО «Консультативно-диагностический центр», г. Рязань;

ФГБОУ ВО «Государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», г. Рязань

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) представляют важную медицинскую проблему. Наиболее частые возбудители ИМП – граммотрицательные бактерии кишечной группы, доминирующий вид – *Escherichia coli* (61%). Стандартный метод обнаружения энтеробактерий в моче – бактериологический посев имеет недостатки: длительность, субъективные ошибки при визуальной оценке титра бактерий, вероятность ложноположительных результатов, связанных со вторичной контаминацией клинических проб. Повысить эффективность микробиологических исследований мочи на наличие бактериурии позволяют автоматические системы скрининга. Проведена сравнительная характеристика чувствительности автоматической системы скрининга бактериурии технологией HB α L ALIFAX и традиционных методов посева мочи. Исследовано 676 образцов мочи от пациентов с хроническими заболеваниями мочевыводящих путей. Бактериологический метод определения живых бактерий включал прямой посев осадка мочи на агаровые среды с подсчетом КОЕ/мл. При использовании HB α L ALIFAX технологии нативные образцы мочи культивировали на зугон-бульоне, при +37°C и постоянном аэрировании. Количество живых бактерий определяли через 45 мин, используя принцип лазерного светорассеяния. Выявлено 187 положительных образцов, из них 139 (74,3%) диагностированы как положительные обоими методами. В 66 пробах (47,5%) обнаружены *Escherichia coli* в диагностически значимых концентрациях при использовании ALIFAX технологии и прямого посева (7×10^4 – 3×10^7 КОЕ/мл и 5×10^3 – 15×10^6 КОЕ/мл соответственно). У 73 пациентов *Escherichia coli* выделена только со сред накопления при отрицательных результатах автоматического скрининга, что указывает на некорректное взятие клинических образцов. Результаты, полученные HB α L ALIFAX технологией и прямым посевом, совпали в 100%, что подтверждает высокую чувствительность автоматической системы при скрининге бактериурии с минимальными сроками исследования. Преимущество HB α L ALIFAX технологии заключается также в исключении ложноположительных результатов, связанных с нарушением техники взятия клинических образцов мочи.

Антилизоцимная активность некоторых возбудителей внутрибольничных инфекций

Блиева Л.З.

ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет», г. Нальчик

Лизоцим (N-ацетилмурамидаза) является ферментом, разрывающим 1-4-гликозидную связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмураминовой кислотой в молекуле пептидогликана клеточной стенки бактерий, в результате чего происходит лизис бактерий. Роль лизоцима в защите макроорганизма от инфекции общеизвестна. Антилизоцимная активность является одним из факторов, повышающих толерантность бактерий к действию сывороточного лизоцима человека и животных. Свойство бактерий специфически инактивировать лизоцим хозяина – антилизоцимная активность – широко встречается у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, у стафилококков, у стрептококков и др.

Целью нашей работы было определение антилизоцимной активности некоторых возбудителей внутрибольничных инфекций (ВБИ), возникающих у больных после госпитализации. В последние десятилетия ВБИ становятся все более значимой проблемой здравоохранения, в экономически развитых странах они возникают у 5–10% пациентов, что значительно отягощает течение основного заболевания, создавая угрозу для жизни больного. Основные возбудители ВБИ – граммотрицательные энтеробактерии, стафилококки и стрептококки.

В работе использовано 18 штаммов *Escherichia coli*, 19 штаммов *Serratia marcescens*, 19 штаммов *Klebsiella pneumoniae*, 17 штаммов *Staphylococcus aureus* и 15 штаммов *Streptococcus pyogenes*. Все штаммы являлись музейными культурами кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии медицинского факультета.

Антилизоцимная активность выявлена у подавляющего большинства исследуемых культур: 14 штаммов *E. coli* (77,8%), 16 штаммов *S. marcescens* (84,2%), 18 штаммов *K. pneumoniae* (94,7%), у всех штаммов *S. aureus* и *S. pyogenes*.

Определили уровень антилизоцимной активности исследуемых бактерий. К штаммам с низким уровнем антилизоцимной активности относили культуры с активностью 1–2 мкг/мл, к штаммам со средним уровнем – 3–5 мкг/мл, с высоким – 6 мкг/мл.

Уровень антилизоцимной активности у большинства изученных культур был средним и высоким. Среди антилизоцимных бактерий у *E. coli* выявлено 3 штамма с низким уровнем (16,7%), 7 штаммов со средним уровнем (38,9%) и 4 штамма с высоким (22,2%); у *S. marcescens* 2 штамма с низким (10,5%) и по 7 штаммов со средним и высоким (по 36,8%); у *K. pneumoniae* 2 штамма с низким (10,5%), 6 штаммов со средним (31,6%) и 10 штаммов с высоким уровнем (52,6%); у *S. aureus* и *S. pyogenes* все штаммы обладали высоким уровнем антилизоцимной активности.

Средние значения уровня антилизоцимной активности всех исследованных штаммов и антилизоцимных штаммов составили соответственно: у *E. coli* – 3,12 и 4,04 мкг/мл; у *S. marcescens* – 3,84 и 4,56 мкг/мл; у *K. pneumoniae* 4,58 и 4,83 мкг/мл; у *S. aureus* и *S. pyogenes* по 6 мкг/мл.

Таким образом, у подавляющего большинства исследованных бактерий выявлена антилизосимная активность. У различных микроорганизмов выработались механизмы устойчивости к лизосиму, в основе которых лежит специфическая или неспецифическая инактивация данного белка.

Изучение этиологической структуры возбудителей при флегмоне лица

Боев И.А., Годовалов А.П.

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера», г. Пермь

В настоящее время профилактика и лечение хирургических инфекций в стоматологии остается одной из актуальных проблем медицины. Численность больных с флегмонами продолжает оставаться на достаточно высоком уровне, увеличивается число тяжелых форм заболевания.

Цель исследования – оценить состав микрофлоры флегмон лица, в том числе у пациентов с сопутствующей соматической патологией.

Материалы и методы. Для проведения классического микробиологического исследования использовали отделяемое флегмон лица 137 пациентов (L03.2), находившихся на лечении в Стоматологической больнице многопрофильного клинического центра ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России в 2016 г.

Результаты. В раневом отделяемом флегмон микроорганизмы обнаружены в 80,3% случаев, из них только один вид – в 88,2%, два – в 10,9% и три – в 0,9% проб. Отсутствие роста микроорганизмов в 20% случаев связано с особенностями проведения микробиологических исследований. Вклад таких микроорганизмов в развитие инфекционно-воспалительных заболеваний занижен, хотя они принимают участие как в формировании очага деструкции, так и в межмикробных взаимодействиях, зачастую отягощая течение процесса. В материале отделяемого при флегмонах были обнаружены преимущественно грамположительные кокки (90,6%), из них *Staphylococcus spp.* в 48,1%, а *Streptococcus spp.* – в 51,9% проб. Среди стафилококков коагулазоположительных видов было 19,6%. Из числа представителей семейства *Enterobacteriaceae* обнаружены *Escherichia coli* (22%) и *Enterobacter aerogenes* (11%). *Acinetobacter spp.* изолирован из 1,7% проб. В 54,5% случаев одновременно изолированы стрептококки и стафилококки. В трети случаев грамположительные кокки выделены в совокупности с грамотрицательными бактериями (27,3%). Микроорганизмы рода *Neisseria* присутствовали только вместе со стрептококками (9,1%). Интерес представляет изучение микрофлоры отделяемого флегмон в зависимости от наличия сопутствующей соматической патологии. У таких пациентов чаще обнаружены ассоциации микробов, а также в большем количестве случаев выделены *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus viridans*.

Заключение. Среди возбудителей флегмоны лица ведущее место занимают грамположительные кокки и их ассоциации как между собой, так и с другими микроорганизма-

ми. В случае наличия сопутствующей соматической патологии показано преобладание в отделяемом флегмон микробных ассоциаций.

Биопленки и неферментирующие бактерии

Болдырева В.В., Дорофеева О.В., Куксина Н.В.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области», г. Тула

Тот факт, что бактерии способны образовывать сложные сообщества, микробиологам известен со времен Левенгука. Но то, что более 99% бактерий существуют в природных экосистемах не в виде свободноживущих клеток, а в виде специфически организованных прикрепленных к субстрату биопленок, стало известно только в последнее десятилетие XX века благодаря развитию и применению новых микробиологических и молекулярно-биологических методов исследования. Биопленки рассматриваются в настоящее время как форма адаптации бактерий к условиям внешней среды.

В своей практике, при проведении санитарно-бактериологического контроля мы столкнулись с бактериальной диагностикой сообщества неферментирующих бактерий в биопленках, сформированных на внутренних поверхностях емкостей и пластиковых трубок технологического оборудования, используемого при получении «воды очищенной».

Исследуя в ходе контроля новый для предприятия продукт, который должен обладать антисептическим действием, было обнаружено его загрязнение бактериями, похожими на *Pseudomonas aeruginosa*. Классические биохимические тесты не подтвердили наличие синегнойной палочки в данном продукте. Для идентификации выделенных культур использовался бактериологический полуавтоматический анализатор AutoScan 4. В 9% образцов было подтверждено присутствие *Burkholderia cepacia* (прежнее название *Pseudomonas cepacia*) с вероятностью 99,99%. С такой же вероятностью в одном образце обнаружена *Stenotrophomonas maltophilia* (прежние названия *Pseudomonas maltophilia*, *Xanthomonas maltophilia*), также относящаяся к группе неферментирующих бактерий, но оксидазотрицательных.

С целью определения источника загрязнения продукта исследовалось сырье. В результате в 15,4% образцах очищенной воды была также обнаружена культура *Burkholderia cepacia*. Дополнительно проводились исследования смывов с рук и спецодежды персонала, технологического оборудования. В 27% смывов с оборудования были обнаружены разные неферментирующие бактерии.

Полученные знания по санитарно-эпидемиологической значимости неферментирующих бактерий необходимы нам для развития эффективных стратегий для клинической диагностики и контроля состояния окружающей среды. По всей видимости, неферментирующие бактерии еще долгое время будут представлять серьезную проблему для эпидемиологов, микробиологов и клиницистов.

Опыт оптимизации методики бактериологического исследования мочи

Бондаренко А.П., Шмыленко В.А.

ФБУН «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, г. Хабаровск

Необходимым условием для подтверждения диагноза «инфекция мочевыводящих путей» (ИМВП) и выбора адекватной антибактериальной терапии является бактериологическое исследование мочи с выделением возбудителя и определением его чувствительности к антибиотикам.

Большинство клинико-диагностических лабораторий проводит бактериологический анализ мочи в соответствии с действующим до настоящего времени Приказом №535 МЗ СССР от 22.04.1985 г. Поскольку для постановки диагноза важна количественная характеристика выявленного возбудителя, основным приемом определения титра бактерий в моче был 4-секторный метод посева мочи стандартизированной петлей на чашки с питательным и кровяным агаром. После инкубации посевов в термостате проводился учет количества выросших в секторах колоний с определением степени бактериурии в соответствии с оценочной таблицей.

Эта методика имеет ряд существенных недостатков: она трудоемка, не стандартизована, имеет низкую воспроизводимость результатов при повторных испытаниях, не пригодна для количественного определения протея в моче (роящиеся формы протея затягивают все 4 сектора чашки, что делает невозможным количественный учет возбудителя). Использование при посеве только двух питательных сред ограничивает число выявляемых возбудителей ИМВП.

В наших исследованиях для количественной характеристики возбудителя применялся метод десятикратной титрации мочи в физиологическом растворе до разведения 10^{-4} – 10^{-5} степени. Высев цельной мочи выполнялся по 0,1 мл на 5 чашек: с кровяным агаром, средой Эндо, желточно-солевым агаром, средой Сабуро, энтерококкагаром. Такой набор сред позволяет выделить основные уропатогены. Для определения количества бактерий в моче высев проводился из пробирок с разведениями 10^2 – 10^3 – 10^5 степени по 0,1 мл на отдельные для каждого разведения чашки с простым агаром. Всего на каждую пробу мочи использовалось 8 чашек со средами. Учет посевов с подсчетом выросших на чашках колоний проводился через сутки роста в термостате, затем еще через сутки содержания посевов при 22–25°C. Идентификация возбудителя проводилась классическим методом. Чувствительность выделенных патогенов к антибиотикам определялась методом дисков на агаре Мюллера–Хинтона по отношению к антибактериальным препаратам 26 наименований, а также к специфическим лечебным бактериофагам.

Таким образом, оптимизированная схема бактериологического исследования мочи позволяет выделять широкий спектр возбудителей ИМВП, более точно определять степень бактериурии, устанавливать количество выделяемого протея. Большой диапазон дисков с антибактериальными препаратами и лечебных бактериофагов, используемых

для тестирования возбудителя, представляет необходимое сопровождение для выработки рациональной терапии ИМВП.

Аллельный полиморфизм генов «домашнего хозяйства» R-вариантов *Vibrio cholerae*, выделенных в Приморском крае в 2016 г.

Бочалгин Н.О.¹, Миронова Л.В.¹, Хунхеева Ж.Ю.¹, Солодка Н.С.², Алленов А.В.², Балахонов С.В.¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Иркутск;

²ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора, г. Уссурийск

С начала 1970-х гг. на территории Сибири и Дальнего Востока из поверхностных водоемов практически ежегодно изолируются нетоксигенные штаммы *V. cholerae*. В отдельные годы обнаруживаются R-варианты холерного вибриона. Известно, что формирование R-вариантов возбудителя холеры рассматривается как одно из направлений адаптации к условиям среды. С учетом этого необходимо выяснение генетического родства обнаруживаемых в водоемах R-вариантов холерного вибриона с *V. cholerae* O1.

Цель работы – сравнение структуры генов «домашнего хозяйства» штаммов *V. cholerae*, выделенных из объектов окружающей среды Приморского края.

В работе исследовано 2 штамма R-варианта *V. cholerae* (102-2016-N, 156-2016-N) и один нетоксигенный штамм *V. cholerae* O1 217-2016-N, изолированные из озера Солёное (г. Находка) в 2016 г. MLST проводилось по схеме, предложенной P. Garg с соавт., включающей определение нуклеотидной последовательности восьми генов «домашнего хозяйства»: *dnaE*, *lap*, *pgm*, *recA*, *gmd*, *gyrB*, *cat* и *chi*.

Анализ гена *gmd* выявил полное его отсутствие у R-вариантов *V. cholerae*. Гены «домашнего хозяйства» *recA* и *chi* в рамках используемой схемы типирования демонстрируют полную взаимную идентичность. Анализ мутаций в генах *cat*, *pgm*, *recA* и *gyrB* выявил наличие 1, 5, 9 и 14 синонимичных замен соответственно. Мутационный анализ гена *lap* показал три синонимичных и одну несинонимичную замену, приводящую к замещению серина на аланин на поверхности лейцинаминопептидазы R-вариантов *V. cholerae*. Анализ структуры гена *dnaE* выявил 9 замен, 1 из которых несинонимична. Трансверсия аденина в цитозин у R-вариантов ведет к замещению глутамата на аспартат в 317 аминокислотной позиции, которая входит в состав α -спирали единственного домена α -субъединицы ДНК-полимеразы. Следует заметить, что описанные выше аминокислотные замещения не влияют на термодинамическую стабильность белков и не участвуют в формировании их активных центров.

Кластерный анализ исследуемых штаммов показал родство R-вариантов *V. cholerae* – они формируют один сиквенс-тип и совпадают по всем исследуемым фрагментам, тогда как *V. cholerae* O1 относится к другому сиквенс-типу.

Современный алгоритм выделения и идентификации культур патогенных лептоспир

Бренёва Н.В., Киселева Е.Ю.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск

Общепризнанной остается фенотипическая (серологическая) классификация лептоспир. Она удобна для клинической и эпидемиологической практики, так как серогруппа и серовар возбудителя обуславливают тяжесть и выраженность отдельных симптомов заболевания, а также круг основных хозяев, которые могут быть источником и резервуаром инфекции. Определение серогруппы возбудителя позволяет ориентироваться в тактике лечения больных и проведения противоэпидемических мероприятий. В последнем издании определителя Берджи 2010 г. классификация лептоспир основывается на принципах геносистематики, по результатам анализа ДНК и 16S рРНК род *Leptospira* подразделяется на 19 видов, из них восемь патогенных, шесть промежуточных и пять сапрофитических. Основной таксономической единицей по-прежнему остается серовар возбудителя. Поэтому выделенные лептоспиры следует идентифицировать как серологическими, так и молекулярно-биологическими методами.

Изоляция культур лептоспир – процесс сложный, длительный и трудоемкий. Нам удалось отработать методику выделения лептоспир от мелких млекопитающих, основных носителей инфекции в природных очагах, в 2012–2016 гг. в Сибири и на Дальнем Востоке нами выделено семь культур патогенных лептоспир.

Современный алгоритм исследований включает посев материала на специальные жидкие питательные среды; постановку биопробы на морских свинках или золотистых хомячках; длительную инкубацию посевов сначала при 28°C в течение 7–10 дней, затем при комнатной температуре до 2–3 мес или до выделения возбудителя с еженедельным контролем роста методом «темнопольной» микроскопии; дифференциацию патогенных и сапрофитических лептоспир методом ПЦР; очистку культуры в случае ее загрязнения с помощью биопробы; идентификацию чистой культуры методами РМА (реакция микроагглютинации и лизиса лептоспир), MLST (мультилокусное секвенирование) и MALDI-Tof-MS (времяпролетная масс-спектрометрия).

Анализ данных MLST с помощью программы Vector NTI и международного ресурса <http://pubmlst.org/leptospira/> – универсальный метод для подтверждения видовой принадлежности патогенных лептоспир. Метод идентификации лептоспир MALDI-Tof-MS пока окончательно не разработан, мы создали собственную базу референсных спектров 28 эталонных штаммов восьми видов, 21 серогруппы и 28 сероваров возбудителя и апробировали метод на выделенных культурах. Метод прост в исполнении, воспроизводим и может быть использован наряду с MLST.

Создание коллекции авирулентных стабильных штаммов туляреимного микроба для использования в системе подготовки специалистов по работе с ПБА I–II группы патогенности

Вахрамеева Г.М., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

Возбудитель туляремии *Francisella tularensis* относится ко II группе патогенности, вызывая у людей острое заболевание, для лечения которого требуется проведение курса антибиотикотерапии. Поэтому в ходе практических занятий с туляреимным микробом для слушателей курсов по особо опасным инфекциям, не имеющих допуска к работе с ПБА I–II группы патогенности, разрешается использовать только авирулентные штаммы *F. tularensis*. При этом учебные штаммы должны стабильно сохранять определенные свойства, характерные для природных изолятов возбудителя туляремии.

С целью создания таких «учебных» культур три штамма туляреимного микроба из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» были подвергнуты модификации, приведшей к повышению их чувствительности к ультрафиолетовому облучению и дезинфицирующим веществам, а также к стабилизации свойств этих штаммов в результате делеции гена *recA*, продукт которого является одним из ключевых компонентов в системах гомологичной рекомбинации и репарации генома.

Выбранные штаммы обладали следующими особенностями: *F. tularensis* 15 R был высокочувствительным к нормальной кроличьей сыворотке и имел колонии серого цвета; *F. tularensis* 15Δ23-2 (вариант вакцинного штамма 15 НИИЭГ без двух копий гена *iglC*) обладал всеми свойствами родительского штамма, кроме способности размножаться в макрофагах и вирулентности для высокочувствительных животных; *F. tularensis* 3/23, авирулентный вариант штамма *F. tularensis* 503 без двух копий гена *iglC*, сохранивший устойчивость к нормальной кроличьей сыворотке, но утративший способность к размножению в макрофагах и, в отличие от штамма *F. tularensis* 15Δ23-2, способный формировать протективный иммунитет у экспериментальных мышей против заражения вирулентными штаммами туляреимного микроба подвидов *holarctica* и *tularensis*.

Для модификации этих штаммов был использован метод аллельного обмена [Лапин и др., 2011], в результате которого из хромосомы туляреимного микроба была удалена нуклеотидная последовательность с геном *recA*. Полученные штаммы *F. tularensis* RM1(*cap*–Δ*recA*), *F. tularensis* SRM3(*cap*±Δ*iglC*Δ*recA*) и *F. tularensis* SM3(*cap*+Δ*iglC*Δ*recA*) были депонированы в коллекции «ГКПМ-Оболенск».

Отсутствие гена *recA* в созданных штаммах, помимо повышения чувствительности к повреждающим факторам внешней среды, делает невозможным проведение дальнейших генетических манипуляций, связанных с гомологичной рекомбинацией, что, в частности, исключает их использование для создания вирулентных вариантов.

Выявление ДНК туляремийного микроба в органах мелких грызунов методом двухэтапной ПЦР

Вахрамеева Г.М.¹, Павлов В.М.¹, Мокриевич А.Н.¹, Кудрявцева Т.Ю.¹, Татомирова О.В.², Волгина И.В.², Борзыкина Т.Н.²

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Курской области», г. Курск

В Российской Федерации в целом и на территории Центрального федерального округа в частности имеют место спорадические вспышки туляремии, обусловленные циркуляцией возбудителя в природных очагах. В ходе мониторинга природных очагов, как правило, используют бактериологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы выявления возбудителя, его антигенов и ДНК, антител у инфицированных животных. Экспресс-выявление ДНК в органах переболевших мелких грызунов затруднено из-за низкой концентрации ДНК возбудителя в органах таких животных.

Для повышения чувствительности выявления специфичных нуклеотидных последовательностей хромосомы *F. tularensis* в исследуемых образцах были проведены две последовательных ПЦР, амплифицирующих участки хромосомы с геном *iglC* *F. tularensis*, высокоспецифичным для представителей рода *Francisella*. При первой ПЦР, включающей 40 циклов реакции, амплифицировали участок ДНК размером 1000 п.о. с полноразмерным геном *iglC*. При этом происходила амплификация некоторых участков хромосомы генома животных и, возможно, примесной микрофлоры. Полученные ампликоны использовали для второй ПЦР с праймерами, гомологичными участкам внутри гена *iglC* и отстоящим друг от друга на 400 п.о. На этом этапе проводили 15 циклов реакции, что практически исключало выявление синтеза посторонних ампликонов (детектируемых электрофоретическим методом). Предложенный подход позволяет обнаруживать единичные копии фрагмента гена *iglC* *F. tularensis* в анализируемых образцах.

Данная система ПЦР были использована для выявления ДНК *F. tularensis* в органах 15 мышевидных грызунов, отловленных на территории Курской области в январе–марте 2017 г. У 9 животных по данным анализа с помощью набора «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный жидкий» («РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ») обнаружили антитела к возбудителю туляремии, а у 6 грызунов специфические антитела не были обнаружены.

ДНК из органов исследуемых мелких грызунов выделяли с помощью набора для выделения геномной ДНК из биологического материала («Синтол»). Из 9 серопозитивных образцов с помощью двухэтапной ПЦР ДНК *F. tularensis* достоверно выявлена в трех пробах, а из 6 серонегативных образцов следовые количества ДНК *F. tularensis* были детектированы в двух пробах.

Использование набора для выявления ДНК *F. tularensis* методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального

времени («Ген *Francisella tularensis* РФ») дало отрицательные результаты для всех 15 образцов.

Создание иммунохроматографического теста для обнаружения белка NS1 вируса Зика

Ветчинин С.С., Шевяков А.Г., Федюкина Г.Н., Баранова Е.В., Бикетов С.Ф.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

Одной из актуальных проблем для здравоохранения являются лихорадки, передаваемые через укус комара. Из-за неспецифичности клинических симптомов при лихорадках различной этиологии здравоохранение нуждается в тестах, способных дифференцировать эти заболевания. Для подтверждения диагноза «лихорадка Зика», помимо клинических симптомов (сыпь, температура, артралгия) и наличия связи с эндемичным регионом в пределах 2 нед, необходимо выявление анти-Зика IgM антител (ИФА, ИХ), присутствие РНК вируса (РТ-ПЦР), либо антигена ВЗ (ИФА, ИХ) в сыворотке или других биологических образцах. Тесты на IgM антитела неспецифичны из-за перекрестных реакций, а применение РТ-ПЦР ограничено 7–8 днями с момента инфицирования. Поэтому наиболее достоверно выявление в крови пациентов антигенов ВЗ, в частности белка NS1, который появляется в крови больных в высоких концентрациях в начале заболевания и присутствует там на протяжении 7–10 дней.

Целью нашей работы является создание видоспецифической диагностической тест-системы на основе мышинных моноклональных антител (МКА) для обнаружения белка NS1.

Материалы и методы. Мышей линии Balb/c иммунизировали подкожно рекомбинантным коммерческим NS1 ВЗ. После выделяли спленоциты и проводили гибридизацию с использованием ПЭГ. Полученные гибридомы проверяли на специфичность с панелью белков NS1 вирусов Денге (1-4 серогруппа), Западного Нила, желтой лихорадки, японского и клещевого энцефалитов. После нарабатывали и очищали найденные IgG. МКА конъюгировали с коллоидным золотом, и конъюгат использовали для изготовления экспериментальных партий ИХ-тестов.

Результаты. Нами была получена панель гибридом различной специфичности, среди которых обнаружена гибридома, продуцирующая высокоспецифичные и высокоаффинные антитела к белку NS1 ВЗ. Показано, что эти антитела можно использовать в сэндвич-анализе, в частности, в ИХ-тестах, используя одновременно и в качестве связывающих, и выявляющих в составе конъюгатов. Предварительная оценка ИХ-тестов показала высокую специфичность используемого «сэндвича».

Вывод. Нами получены высокоспецифичные МКА, на их основе сконструирован ИХ-тест для обнаружения белка NS1.

Опыт выделения листерий в пищевых продуктах на базе бактериологической лаборатории

Волокитина Е.Н.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае», г. Барнаул

Листерии – род грамположительных палочковидных бактерий. Некоторые виды являются возбудителями заболеваний животных и человека. Встречаются в почве, воде, растениях. Распространен пищевой путь заражения листериозом.

Продукты питания в основном инфицируются листериями в процессе производства и хранения. Согласно литературным данным, листерии можно обнаружить в самых разных видах пищевых продуктов: молочные продукты (сыры, молоко), овощи и салаты, мясо и мясные полуфабрикаты, птица. Исследования пищевых продуктов по показателям безопасности (на *L. monocytogenes*) проводятся на соответствие требованиям Технических регламентов Таможенного союза и санитарных правил.

С этой целью бактериологическая лаборатория ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае» применяет ГОСТ 32031-12 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*», МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах», МУК 4.2.2578-10 «Санитарно-бактериологические исследования методом разделенного импеданса». Включение в методики новых питательных сред, в том числе импортных хромогенных (агар *Listeria* по Оттавиани и Агости), использование высокотехнологичного оборудования (БакТрак 4300) позволило увеличить высеваемость листерий.

Так, в 2014 г. при проведении 656 исследований, листерии были выделены в 19 пробах с учетом повторного исследования проб. Из них 18 – мясные полуфабрикаты (биштекс, котлеты, купаты, люля-кебаб, рагу, ребрышки, набор для хаша, грудинка говяжья) и 1 культура – рыбные пресервы.

После корректировки производственных программ для предприятий, занимающихся мясо- и рыбопереработкой, в 2015 г. из 1191 исследованных проб на листерии выделено 8 культур. Из них 7 – мясо и мясные полуфабрикаты (почки свиные, колбаса полукопченая, грудинка свиная, зразы, колбаски для гриля, тушка цыпленка замороженная, полуфабрикат пельмени) и 1 – котлеты рыбные полуфабрикат. Из 2375 проб в 2016 г. выделена 1 культура – мясные полуфабрикаты (пельмени), в 1 полугодии 2017 г. из 1093 выделено 4 культуры из мяса и мясных полуфабрикатов (хинкали, говядина отруб, пельмени, купаты). Для идентификации использовался классический бактериологический метод, а также анализатор Микротакс.

Локальный антиоксидантный индекс в копрофильтратах беременных как показатель угрозы передачи возбудителей инфекций

Гапон М.Н., Полищук И.С., Наумова М.А.

ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии», г. Ростов-на-Дону

Работа посвящена поиску критериев, выявлению групп риска развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в родовспомогательных учреждениях.

Широко известно, что причиной возникновения внутрибольничных инфекций (ВБИ) является распространение условно-патогенных бактерий. Однако их отсутствие у беременных при госпитализации в родильные дома обязательным условием не является. Исследованиями последних лет показано, что у людей с дисбиозом кишечника II–III степени локальный антиоксидантный статус снижается и, сочетаясь с ослаблением местной иммунной защиты, способствует транслокации условно-патогенной микрофлоры (УПМ) внутри организма и свидетельствует о возможности ее передачи окружающим лицам.

С целью разработки критериев отбора лиц, являющихся потенциальными переносчиками УПМ в роддомах, мы использовали установленные нами параметры локального антиоксидантного индекса (ЛАИ) у людей с дисбиозом кишечника. Для выявления этого состояния было обследовано 78 беременных на разных сроках гестации: 25 человек – в первом триместре беременности, 20 – во втором, 33 – в третьем. Так как у всех беременных обнаруживалось нарушение микробного равновесия, в качестве контроля был взят материал от 22 условно-здоровых небеременных женщин 20–38 лет с нормобиоценозом. Микробный пейзаж фекалий исследовали бактериологическим методом с параллельным определением в образцах копрофильтратов (10^{-2}) ЛАИ.

При сопоставлении ЛАИ с бактериологическими данными было установлено, что в контрольной группе ЛАИ был выше 20 у.е., у беременных с дисбиозом – менее 20 у.е. Величина ЛАИ коррелировала со степенью микробного дисбаланса и не зависела от срока гестации. У части беременных с ЛАИ ниже 14 у.е. дисбиоз носил пролонгированный характер, независимо от срока гестации. На основании вышеизложенного можно заключить, что ЛАИ, дифференцирующий степень дисбиоза, можно использовать как показатель угрозы передачи возбудителей инфекций беременными в условиях стационара.

Изучение антимикробных и обеззараживающих свойств новой перекисной дезинфицирующей композиции

Гайтрафимова А.Р., Герасимов В.Н., Быстрова Е.В., Дятлов И.А.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

В настоящее время эпидемиологическая обстановка в стране и в мире в целом остается нестабильной. Все большую обеспокоенность вызывает рост очагов опасных и особо опасных инфекций, связанных с изменением климата, нарушением экологического равновесия, ростом техногенных и природных катастроф. В профилактике инфекционных болезней и ликвидации эпидемиологических очагов большое значение имеет создание резерва высокоэффективных, безопасных дезинфицирующих средств. Отечественный рынок дезинфектантов располагает большим арсеналом современных композиционных препаратов, однако не все они отвечают требованиям, предъявляемым к дезинфицирующим средствам для ликвидации очагов опасных и особо опасных инфекций (ООИ).

Для ликвидации очагов ООИ, дезинфекционной обработки поверхностей помещений, изделий медицинского назначения, лабораторной и столовой посуды, медицинских отходов, уборочного инвентаря, материалов и оборудования в медицинских, детских учреждениях, в коммунально-бытовом хозяйстве, в учреждениях общественного питания, на транспорте и т.д., в отделе дезинфектологии ФБУН ГНЦ ПМБ разработана новая перекисная композиция. В ее состав входят: действующее вещество – перекись водорода медицинская; четвертичное аммониевое соединение – алкилдиметилбензиламмония хлорид (АДБАХ); Тритон X-100; ПЭГ-200 и другие функциональные добавки. Данная дезинфицирующая композиция представляет собой бесцветную жидкость со слабым специфическим запахом, обладающую мощными свойствами.

Проведены исследования антимикробной, обеззараживающей активности новой перекисной композиции, изучен механизм действия данного средства с использованием микробиологических, физико-химических методов, а также методов визуализации в электронном микроскопе структурных повреждений бактерий и спор при контакте с дезинфектантом.

Установлено, что предлагаемая перекисная композиция при довольно низких концентрационно-временных параметрах обладает выраженными бактерицидными, спороцидными и фунгицидными свойствами. Рабочие растворы препарата в концентрациях 0,25–0,5% по перекиси водорода обеззараживают поверхности, объекты и материалы, загрязненные бактериями возбудителей ООИ (чума, холера, туляремия, легионеллез). Было также установлено, что данная перекисная композиция в концентрациях 1,0–3,0% по перекиси водорода проявляет высокую эффективность при обеззараживании поверхностей, объектов и материалов, загрязненных спорами бактерий возбудителя сибирской язвы.

При помощи электронной микроскопии и физико-химическими методами исследования было показано, что при кратковременном контакте бактерий возбудителей ООИ с дезинфектантом происходит разрушение большей части бактерий в популяции: наблюдается повреждение цитоплазматической и внешней мембран, разрыв клеточной оболочки с выходом из клетки низкомолекулярных компонентов цитоплазмы, белков, ДНК. При воздействии на споры бактерий растворами дезинфектанта наблюдали разрыв спорных оболочек, повреждение кортекса с выходом из спорной клетки дипиколиновой кислоты, белка, ДНК.

Полученные результаты исследований свидетельствуют, что предлагаемая перекисная композиция обладает универсальной антимикробной и обеззараживающей активностью и может быть рекомендована для неспецифической профилактики опасных и особо опасных инфекций, включая сибирскую язву.

Полигон для испытания дезинфицирующих средств, предназначенных для ликвидации почвенных сибиреязвенных скотомогильников

Герасимов В.Н., Котов С.А., Маринин Л.И., Дятлов И.А.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

В настоящее время эпидемиологическая ситуация по сибирской язве остается сложной в связи с существованием резервуаров сибиреязвенного микроба, которыми являются скотомогильники и стационарно неблагополучные территории.

Основными средствами деконтаминации почвы, зараженной спорами бактерий возбудителя сибирской язвы, продолжают оставаться дезинфектанты химической природы, обладающие антимикробными и спороцидными свойствами.

Установлена высокая эффективность большого числа химических дезинфицирующих средств при дезинфекции поверхностей, объектов и материалов, загрязненных бактериями, грибами и спорами, в лечебно-профилактических учреждениях, в коммунально-бытовом хозяйстве и на животноводческих предприятиях. Однако следует отметить, что масштабное применение любого из этих препаратов для деконтаминации грунта от спор в сибиреязвенных скотомогильниках без предварительного его испытания на различных объемах грунта, без определения режимов дезинфекции грунта, без разработки соответствующей технологии обеззараживания грунта на разную глубину является дорогостоящей, неэффективной и весьма опасной работой по ликвидации почвенных сибиреязвенных скотомогильников для экологии, безопасности людей и животных.

Для экспериментального отбора эффективных дезинфицирующих средств для обеззараживания почвы, загрязненной спорами возбудителя сибирской язвы, для разработки режимов обеззараживания любых видов грунта с различными структурными и физико-химическими характеристиками при различных климатических условиях, а также для разработки технологических приемов обеззаражива-

ния почвенных сибиреязвенных скотомогильников предлагается проект полигона для испытаний дезинфицирующих средств, предназначенных для ликвидации почвенных сибиреязвенных скотомогильников.

Предлагаемый полигон представляет собой закрытое помещение или отгороженную территорию, предназначенную для работы с микроорганизмами 1–4 групп патогенности, на которых установлены техническое устройство, моделирующее в значительно уменьшенном масштабе сибиреязвенный скотомогильник (по размерам и объему не менее 2500 крат), структуру и физико-химические характеристики грунта, уровень контаминации спорами сибирской язвы грунта скотомогильников, климатические условия географической местности или региона, где расположены скотомогильники (температура окружающей среды, температура грунта, уровень влажности грунта и т.п.), емкость для сбора отработанного грунта и набор технических средств и материалов для обеспечения безопасных условий работы на полигоне. Полигон для испытаний и отбора дезинфицирующих средств, предназначенных для ликвидации почвенных сибиреязвенных скотомогильников, позволяет без существенных материальных и финансовых затрат в безопасных условиях выполнять необходимый перечень работ по испытанию дезинфицирующих средств, отобранных для ликвидации почвенных сибиреязвенных скотомогильников, проводить подготовку и тренировку персонала для выполнения работ по обеззараживанию грунта сибиреязвенных скотомогильников, включая другие почвенные очаги сибирской язвы.

Распространенность возбудителей инфекций, передаваемых половым путем, среди беременных одного из районов Ленинградской области

Глади́н Д.П.¹, Козлова Н.С.²

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», г. Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова», г. Санкт-Петербург

Инфекции, передаваемые половым путем (ИППП), продолжают оставаться одной из нерешенных проблем современной медицины, приводя к развитию бесплодия, прерыванию беременности, внутриутробному инфицированию плода и другим грозным осложнениям. Стертость клинической симптоматики или ее полное отсутствие затрудняет своевременную клиническую диагностику таких инфекций, и основными методами выявления возбудителей ИППП на сегодняшний день являются молекулярно-биологические методы, среди которых чаще всего используются различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Целью исследования было определение распространенности различных возбудителей ИППП среди беременных Лодейнопольского района Ленинградской области.

Материалы и методы. С использованием ПЦР в 2015 г. было обследовано 530 беременных Лодейнопольского райо-

на, 478 из них – на *Chlamydia trachomatis*, 225 – на *Mycoplasma hominis*, 448 – на *Mycoplasma genitalium*, 514 – на *Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum*, 216 – на *Trichomonas vaginalis*, 410 – на *Gardnerella vaginalis*, 68 – на *Neisseria gonorrhoeae*, 152 – на *Candida albicans*, 252 – на *Cytomegalovirus*, 277 – на *Herpes simplex virus* 1, 2 типа, 104 – на HPV 16/18 и 88 исследований – на HPV-комплекс. Использовались тест-наборы производства Центрального НИИ эпидемиологии (Москва, Интерлабсервис), анализ амплифицированных фрагментов ДНК производился при помощи прибора АЛА ¼ (детекция по «конечной точке»).

Результаты. Наиболее распространенными возбудителями ИППП среди беременных оказались *U. parvum* и *U. urealyticum*, которыми были инфицированы 332 человека (64,6%) и *G. vaginalis*, которая встречалась у 226 беременных (55,1%). При этом *U. parvum* была выявлена у 277 человек (53,9% от числа обследованных и 83,4% от числа инфицированных), в то время как *U. urealyticum* и микст-инфекция (*U. parvum/U. urealyticum*) обнаруживались значительно реже (6,0% и 4,7% от числа обследованных и 9,3% и 7,2% числа инфицированных соответственно). Удельный вес остальных возбудителей ИППП был гораздо ниже. Так, специфические фрагменты ДНК *C. trachomatis* были выявлены только у 6,5% обследованных (31 беременная), *M. hominis* и *M. genitalium* – у 12% (27 человек) и 4,5% (20 беременных) обследованных соответственно. Нечастыми оказались находки вирусных ДНК, так, *Cytomegalovirus* был выявлен только у 21 человека (8,3%). *Herpes simplex virus* 1, 2 типа – у 8 человек (2,9%). Интересным представляется, что при редком обнаружении HPV 16/18 типов (6 обследуемых, или 5,8%, и у одной беременной, или 1,0% соответственно), HPV-скрининг был положителен у 19 человек (21,6%), что говорит о распространении среди беременных и других типов вирусов папилломы высокого канцерогенного риска. ДНК *T. vaginalis* и *C. albicans* были выявлены у небольшого количества обследованных (5,6% и 3,3% соответственно), а ДНК *N. gonorrhoeae* не была выявлена ни у одной пациентки. В целом наличие одной или нескольких инфекций наблюдалось у 332 пациенток (62,6%), при этом максимальное количество выявленных возбудителей ИППП было обнаружено у одной пациентки (0,2%) и было представлено комбинацией пяти инфекционных агентов (*C. trachomatis/M. genitalium/U. parvum/G. vaginalis/Cytomegalovirus*). У 8 человек выявлен микст из четырех возбудителей (1,5%), три инфекции выявлялись у 44 человек (8,3%), две – у 110 обследуемых (20,7%). У большего числа пациенток (169 человек) выявлена ДНК одного возбудителя (31,9%). Ни одной инфекции не обнаружено у 37,4% обследуемых (198 человек).

Выводы. Проведенное исследование показало широкое распространение возбудителей ИППП среди беременных Лодейнопольского района Ленинградской области, у почти двух третей из которых (62,6%) был выявлен хотя бы один возбудитель ИППП с преобладанием *U. parvum* (53,9%) и *G. vaginalis* (55,1%). У трети беременных (31,9%) выявлялся один, у 20,7% – два инфекционных агента. Была выявлена пациентка, инфицированная одновременно пятью возбудителями ИППП.

Апробация бесприборных методов визуализации результатов петлевой изотермической амплификации (LAMP) ДНК токсигенных штаммов *Vibrio cholerae*

Гладких А.С.¹, Миронова Л.В.¹, Баранова Е.В.², Щит И.Ю.², Пономарева А.С.¹, Хунхеева Ж.Ю.¹, Басов Е.А.¹, Бикетов С.Ф.²

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk

Поиск новых методов быстрой идентификации возбудителей особо опасных инфекций необходим как в клиническом аспекте, так как позволяет ускорить диагностику и снизить тяжесть течения заболеваний, так и в эпидемиологическом, способствуя установлению источника, путей распространения патогенов и локализации вспышек в кратчайшие сроки (Harwood et al., 2004; Akond et al., 2008). Петлевая изотермическая амплификация (LAMP) является одним из новейших подходов в диагностике, превосходящим обычную ПЦР по скорости, простоте постановки, высокой специфичности и низкой стоимости.

Цель работы – апробация альтернативных электрофорезной регистрации результатов LAMP. В рамках эксперимента была проведена апробация двух методов бесприборной детекции: окраска интеркалирующим ДНК-красителем SYBR Green и дот-блот гибридизация на примере десяти музейных штаммов *V. cholerae* с помощью двух наборов праймеров (Vc7 и Vc173), специфичных участку гена субъединицы А холерного токсина (*ctxA*).

В результате применения метода визуализации окраской SYBR Green для большинства штаммов *V. cholerae* чувствительность реакции установлена на уровне 10^4 м.к./мл с возможностью обнаружения в отдельных случаях более низких концентраций возбудителя (до 10^2 м.к./мл). Данный подход характеризуется простотой выполнения процедуры, при этом время анализа сокращается до минимальных сроков (менее 2 ч), а результаты воспроизводимы регистрируются визуально.

Проведение детекции LAMP методом блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах (дот-блот) показало более низкую чувствительность. При этом необходимым условием является применение в LAMP праймеров с биотиновой меткой. По полученным данным, чувствительность биотинилированных праймеров по сравнению с праймерами без метки ниже в среднем и, в зависимости от вида праймеров, составляет 10^4 – 10^5 м.к./мл (Vc173) и 10^6 – 10^7 м.к./мл (Vc7).

Таким образом, в проведенных испытаниях установлена возможность успешного применения бесприборных методов детекции результатов LAMP для токсигенных штаммов *V. cholerae*. Высокую чувствительность и простоту применения, что является особо ценным при работе в полевых условиях, показал метод окраски интеркалирующим ДНК-красителем SYBR Green. Блоттинг на мембранах также может быть использован как альтернатива электрофорезной регистрации, однако применение данного подхода требует достаточно высоких концентраций возбудителя в пробах, дополнительного времени и лабораторных условий применения.

Антибиотикорезистентность клинических изолятов *Staphylococcus epidermidis* у кардиохирургических пациентов в зависимости от вида хирургического вмешательства

Граничная Н.В.^{1,2}, Зайцева Е.А.², Бондарь В.Ю.¹, Андреев Д.Б.¹

¹ФГБУ «Центр сердечно-сосудистой хирургии», г. Хабаровск;

²ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», г. Владивосток

Цель. Оценить особенности антибиотикорезистентности клинических изолятов *S. epidermidis*, выделенных от пациентов, перенесших различные виды хирургического лечения в кардиохирургическом стационаре за трехлетний период.

Материалы и методы. В исследование включены 64 изолята *S. epidermidis*, выделенные из биологического материала пациентов кардиохирургического профиля в 2015–2017 гг. – раневого отделяемого операционных ($n = 8$) и послеоперационных ран грудины ($n = 36$) от пациентов, перенесших операции аортокоронарного шунтирования, протезирования клапанов ($n = 3$), операции по поводу врожденных пороков сердца ($n = 3$) с применением искусственного кровообращения, а также операции по имплантации электрокардиовертера ($n = 3$), и отделяемое ран других локализаций (область шеи, бедра, паховая область) при проведении операции каротидной эндартерэктомии и бедренно-подколенного шунтирования без искусственного кровообращения, взятых как интраоперационно ($n = 6$), так и в послеоперационном периоде ($n = 5$). Идентификация и определение чувствительности к антимикробным препаратам проводились с помощью микробиологического анализатора «Vitek 2 compact» (BioMerieux).

Результаты. Было выявлено, что у изолятов *S. epidermidis*, выделенных из послеоперационных ран грудины от пациентов, перенесших операции аортокоронарного шунтирования, резистентность к бензилпенициллину составила 100%, к оксациллину – $83,3 \pm 6,2\%$, к эритромицину – $71,4 \pm 7,6\%$, к гентамицину – $57,1 \pm 8,3\%$, к линкозамидам (линкомицину и клиндамицину) по $53,0 \pm 8,5\%$ соответственно, к фторхинолонам (ципрофлоксацину и левофлоксацину) – $63,8 \pm 8,0\%$, к моксифлоксацину – $51,4 \pm 8,4\%$. Изоляты *S. epidermidis*, выделенные из ран грудины, во время операции аортокоронарного шунтирования, протезирования клапанов и операции по врожденным порокам сердца в условиях искусственного кровообращения показали следующую антибиотикорезистентность: к бензилпенициллину – $71,4 \pm 12,0\%$, оксациллину и эритромицину – $35,7 \pm 12,8\%$, гентамицину и линкозамидам – $28,5 \pm 12,0\%$, к ципрофлоксацину и левофлоксацину – $21,4 \pm 10,9\%$, моксифлоксацину – $14,2 \pm 9,3\%$. У изолятов *S. epidermidis*, полученных из отделяемого ран других локализаций и ложа электрокардиовертера, отмечено, что в большинстве случаев выраженной устойчивостью обладали штаммы, выделенные в послеоперационном периоде, ко всем исследуемым препаратам. В 2016 и 2017 гг. выделено по одному штамму с промежуточной устойчивостью к ванкомицину (из отделяемого послеоперационной и операционной ран грудины).

Заключение. В результате проведенного исследования выявлено, что антибиотикорезистентность наиболее выражена у изолятов *S. epidermidis*, выделенных из послеоперационных ран независимо от вида хирургического вмешательства.

Применение метода полимеразной цепной реакции в диагностике гриппа и ОРВИ

Губарева Т.И., Иванова О.В.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае», г. Барнаул

По данным ВОЗ, инфекции дыхательных путей представляют собой одну из главных причин заболеваемости и смертности у всех возрастных групп. В связи с этим повышается значимость лабораторных исследований, обеспечивающих возможность раннего выявления источника заболевания. Использование ПЦР-диагностики позволяет расшифровать этиологию заболевания в режиме реального времени.

Диагностика ОРВИ/гриппа в Центре гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае проводится на базе лаборатории исследований методом ПЦР с использованием мультиплексных наборов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» и «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора») на приборах RotorGene 6000 и ДТ прайм. Проанализированы результаты исследования 3138 проб биоматериала за период 2015–2016 гг. и 8 месяцев 2017 г., из них РНК/ДНК возбудителей ОРВИ/гриппа выявлена в 894 пробах (28,5%). При анализе выявленных возбудителей заболеваний гриппа/ОРВИ в течение всего периода отмечено преобладание в исследуемых пробах вирусов гриппа А и В – 457 проб (51% от общего количества проб с выявленной патологией). На 2-м месте по частоте встречаемости – риновирус (202 пробы, или 22,6%), на 3-м месте – респираторно-синцитиальный вирус (76 проб, или 8,5%). При выявлении РНК вируса гриппа отмечается зимне-весенняя сезонность, тогда как при выявлении возбудителей ОРВИ сезонность менее выражена.

В течение 2015–2016 гг. и 8 месяцев 2017 г. среди вирусов гриппа преобладал вирус гриппа А (352 пробы или 77% от выявленных вирусов гриппа). При генотипировании РНК в 2015 г. отмечалась распространенность субтипа H3N2 и грипп В; в течение 2016 г. доминировал субтип H1N1sw2009 и в меньшем количестве субтип H3N2. С начала 2017 г. обнаруживался субтип H3N2.

Также было установлено, что пик видового разнообразия вирусных респираторных инфекций в структуре заболеваемости приходится на возрастную группу детей до 2 лет. Это может быть объяснено общей «незрелостью» иммунной системы детей и, как следствие, большей восприимчивостью детей к респираторным вирусным инфекциям.

Использование быстрых тестов на основе ПЦР для выявления инфекций дыхательных путей поможет врачу своевременно принять решение о назначении необходимой терапии и снизит частоту неоправданного назначения антибактериальных препаратов.

Биологические свойства условно-патогенных микроорганизмов, выделенных у больных ревматическими заболеваниями

Гульнева М.Ю., Малафеева Э.В., Романов В.А., Богомолова Н.С.

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», г. Ярославль

Опportunистические микроорганизмы, обладая выраженной биологической и экологической пластичностью и определенной вирулентностью, способны играть ведущую роль при многих патологических состояниях (Бондаренко В.М., 2011; Laabei M. et al., 2014).

Проведено сравнительное исследование биологических свойств 412 штаммов условно-патогенных микроорганизмов, выделенных у больных ревматическими заболеваниями (РЗ), с идентичными по видовой и родовой принадлежности музейными и клиническими культурами. Культуры получены при бактериологическом исследовании материала со слизистых оболочек носа. Изучение биологических свойств бактерий показало, что в организме больных РЗ присутствуют микроорганизмы с высоким адгезивным потенциалом. У больных РЗ культуры стафилококков в 88,5% и кишечных бактерий в 100% случаев проявляли адгезивные свойства. При РЗ определялись штаммы стафилококка и бактерий рода *Klebsiella*, отличающиеся существенно более высокими показателями адгезивных свойств.

Микроорганизмы, изолированные у больных, имели выраженную антилактоферриновую активность. Так, штаммы *S. epidermidis* и *E. coli*, выделенные у больных РЗ, характеризовались большим антилактоферриновым потенциалом по сравнению с культурами данных микроорганизмов, полученными у лиц группы сравнения ($p < 0,05$). Выделенные у больных штаммы *S. aureus* отличались большей антилизоцимной активностью, равной $10,10 \pm 2,42$ мкг/мл, а у культур, полученных у лиц группы сравнения, этот показатель был равен $4,40 \pm 1,12$ мкг/мл ($p < 0,01$). Условно-патогенные микроорганизмы, колонизирующие организм больных РЗ, обладали различной способностью к образованию микробных биопленок.

Штаммы *E. coli* и *Proteus vulgaris*, выделенные у больных, обладали большей способностью к пленкообразованию, а культуры *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные у больных РЗ, напротив имели низкую способность к биопленкообразованию ($p < 0,01$). Адгезивные свойства, антилизоцимная, антиферриновая активность и существование внутри биопленок обеспечивают длительную персистенцию микробов в организме больного, отражают агрессивность условно-патогенных микроорганизмов, что может определять участие условно-патогенных микроорганизмов в патологическом процессе при ревматических заболеваниях.

Идентификация бактерий рода *Listeria* с использованием системы MALDI Biotyper

Детушев К.В., Мухина Т.Н., Соломенцев В.И., Богун А.Г.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk

Представители рода *Listeria* – это грамположительные, палочковидные бактерии 0,5 мкм в ширину и 1–1,5 мкм в длину, спор и капсул не образуют. Род *Listeria* включает в себя 17 видов, из которых только *L. monocytogenes* и *L. ivanovii* считаются патогенными. Санитарно значимым среди бактерий рода *Listeria* в РФ считается вид *monocytogenes*. Все случаи заболевания листериозами у человека вызваны *L. monocytogenes* при употреблении зараженных пищевых продуктов. Однако известны случаи заболеваний у людей со сниженным иммунитетом, вызванные *L. ivanovii*.

Точность и скорость сбора данных с помощью времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) MALDI-TOF при анализе микроорганизмов делают этот метод важным инструментом биологического контроля в области здравоохранения и пищевой промышленности.

При исследовании штаммов рода *Listeria*, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk», с использованием двух методов пробоподготовки: прямого нанесения части бактериальной колонии на лунку MALDI-чипа и приготовление белкового экстракта с применением муравьиной кислоты и ацетонитрила. Показано, что спектры, полученные при исследовании белковых экстрактов, характеризуются большим количеством регистрируемых пиков с меньшим количеством шумов по сравнению со спектрами, полученными при исследовании образца непосредственно нанесенного на лунку MALDI-чипа. Независимо от метода нанесения во всех экспериментах была получена надежная родовая идентификация. Однако при прямом нанесении наблюдалась некорректная видовая идентификация, тогда как при исследовании белковых экстрактов только при идентификации *Listeria monocytogenes* в трех случаях на первое место в рейтинге идентификации выходил вид *inposia*, но на втором месте всегда был вид *monocytogenes* со значением Score выше 2.3, характерным для надежной видовой идентификации.

Программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper при исследовании белковых экстрактов показал надежную идентификацию бактерий рода *Listeria*, что делает его хорошим инструментом при исследовании материала от больных листериозами.

Определение чувствительности к антисептикам и дезинфектантам у возбудителей внутрибольничных инфекций в состоянии биопленок

Детушева Е.В., Мицевич И.П., Подкопаев Я.В., Фурсова Н.К.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), представляют серьезную проблему для здравоохранения. Усугубляющим фактором является способность возбудителей ИСМП формировать биопленки, тем самым значительно повышается устойчивость к антимикробным препаратам, в том числе антисептикам и дезинфектантам, по сравнению с планктонными клетками. В связи с этим важное значение приобретают методы, позволяющие определять чувствительность микроорганизмов, в разных физиологических состояниях, к антимикробным препаратам.

В работе использованы антисептики триклозан, хлоргексидин, мирамистин, бензалкония хлорид, цетилпиридиния хлорид и дезинфектанты «Део-хлор», «Централь», «Тотус», «Мистраль форте», «Мистраль», «Главкислород», «Тори ОКСИ», «БебиДез ультра». Микроорганизмы выделены в 2015–2016 гг. в отделениях реанимации и интенсивной терапии г. Москвы и других регионов России ($n = 50$). Чувствительность планктонных культур к препаратам определяли методом серийных разведений в бульоне и на плотных питательных средах, путем нанесения бактериальной суспензии на поверхность питательного агара, содержащего серийные разведения препарата. Чувствительность биопленок определяли методом аппликаторов, нанося аппликатор с отпечатком бактериального газона, моделирующего состояние биопленки, на поверхность питательного агара, содержащего серийные разведения препарата. За МБК принимали минимальную концентрацию биоцида, на которой отсутствовал рост культуры.

В ходе исследования разработан методический подход, позволяющий определять чувствительность микроорганизмов к антисептикам и дезинфектантам, в планктонном состоянии и для биопленок. Показано, что в подавляющем большинстве случаев биопленки современных клинических штаммов проявляют значительно большую устойчивость к антибактериальным препаратам по сравнению с планктонными клетками.

Углубленный анализ чувствительности к антибактериальным препаратам у представителей госпитальных патогенов, включая моделирование бактериальных биопленок для оценки реальной чувствительности к антисептикам и дезинфектантам, является весьма актуальным и важным научным направлением, необходимым для совершенствования контроля ИСМП в Российской Федерации.

N-ацетил-L-цистеин – перспективы использования

**Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н.,
Титова С.В., Корнеева Л.А.**

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт»,
г. Ростов-на-Дону

В настоящее время актуальными являются не только разработка новых фармацевтических препаратов, но также анализ и возможность использования давно известных и хорошо себя зарекомендовавших на практике препаратов, имеющих невысокую себестоимость, доступность, расшифрованный механизм действия и возможность производства в России. Так, на основании многочисленных экспериментальных и клинических исследований известно, что N-ацетил-L-цистеин (АЦЦ) – ацилированная тиолсодержащая аминокислота, являющаяся одновременно предшественником L-цистеина и глутатиона, широко применяется в различных областях медицины. Препарат представлен на отечественном фармацевтическом рынке и издавна используется в качестве муколитического агента для лечения хронических заболеваний легких. Применяется он также внутривенно в виде 20% раствора в качестве антидота при отравлении парацетамолом, может конкурентно ингибировать утилизацию цистеина, реагировать через свою SH-группу с мембранами бактерий и подавлять у них синтез полисахарида, не влияя при этом на его структуру. Обладает выраженным антиоксидантным действием, способен восстанавливать уровень клеточного глутатиона, используется при воспалениях (панкреатиты), фиброзе легких, нарушениях эндотелия сосудов, сохранении трансплантатов, а также лечении гастритов, вызванных *Helicobacter pylori*. В настоящее время обсуждается применение ацетилцистеина при поражении почек, ишемической болезни сердца, ВИЧ-инфекции и других заболеваниях. Механизм его действия основан на разрыве дисульфидных связей высокомолекулярных гликопротеинов слизи, что сопровождается уменьшением вязкости. Как было установлено в последнее время в экспериментальных и клинических исследованиях, препарат обладает способностью уменьшать адгезию некоторых возбудителей к слизистым оболочкам, а также оказывает прямое разрушающее воздействие на внеклеточный матрикс, что позволяет использовать N-ацетил-L-цистеин в терапии инфекций, связанных с образованием биопленок. Потенциал действия АЦЦ к настоящему времени остается не до конца изученным. В России, как и во всем мире, продолжается активный поиск лекарственных средств с высоким потенциалом воздействия на биопленки микроорганизмов. Необходимость в этом объясняется тем, что бактерии, растущие в составе биопленки, проявляют высокую устойчивость к антибиотикам и дезинфицирующим средствам, создавая серьезные проблемы для здравоохранения.

При выполнении исследований использовали: 6 штаммов *Vibrio cholerae* O1 Эль Тор (*ctx+ tcp+*), 6 дефектных по синтезу токсина и токсинорегулируемых пилей штаммов ($\Delta ctx\Delta tcp$), выделенных из воды поверхностных водоемов, 12 штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы, из которых 6 (*ctx+ tcp+*) были выделены из клинического материала, а 6 атоксигенных

($\Delta ctx\Delta tcp$) – из проб воды поверхностных водоемов. Штаммы получали из музея живых культур ФКУЗ Ростовского НИПЧИ. В работе использовали препарат N-ацетил-L-цистеина (Россия). Получение биопленок холерных вибрионов проводили способом, описанным ранее (Титова С.В. и др., 2014). Действие препарата АЦЦ (0,5–4 мг/мл) анализировали по его влиянию на клетки холерного вибриона, этапы формирования биопленки и на уже сформированную 5–30-суточную биопленку. Инкубацию с препаратом проводили при 20°C. Через 0, 1, 3, 6, 24, 48 ч, 5–14 сут инкубации осуществляли высев планктонной культуры и биопленок на пластинки агар Мартена (рН 7,7). Результат учитывали через 24 ч по наличию или отсутствию роста холерных вибрионов.

В результате проведенного исследования обнаружено, что препарат АЦЦ оказывал антибактериальный эффект на клетки холерных вибрионов в концентрации 1–4 мг/мл. Подобное действие он оказывал на планктонную культуру и на процесс образования биопленок у представителей *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп уже через 1–3 ч после добавления в концентрации 1–4 мг/мл. Также он активно действовал на планктонную форму и зрелую 5–7-суточную биопленку, проявляя антибактериальный эффект независимо от наличия/отсутствия генов *ctx AB* и *tcpA* в концентрациях 2–4 мг/мл. Следует отметить, что антибактериальный эффект препарат оказывал на сформированную 30-суточную биопленку и на планктонную культуру в концентрации 4 мг/мл у штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы (*ctx+ tcp+/\Delta ctx\Delta tcp*).

Полученные результаты представляют теоретический и практический интерес, так как препарат может быть использован в терапии случаев диареегенных заболеваний, обусловленных возбудителями II–IV групп патогенности. Исследования N-ацетил-L-цистеина могут в перспективе значительно расширить показания к его применению, а проведенное изучение его влияния на биопленки, в составе которых микроб приобретает свою гиперинфекционность, поможет решить ряд задач практического здравоохранения.

Способность холерных вибрионов гидролизовать поверхностно-активные вещества

Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Шипко Е.С.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт»
Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону

В современном мире человечество увеличивает использование различных химических веществ, включая поверхностно-активные вещества (ПАВ), для своих целей и нужд. Принимая во внимание существование у холерного вибриона группы ферментов, участвующих в утилизации ПАВ, постоянно присутствующих в объектах окружающей среды и в связи с возрастающим антропогенным воздействием, представляет интерес оценка способности холерных вибрионов гидролизовать различные ПАВ для последующего выяснения роли этих ферментов в биологии возбудителя холеры.

Цель исследования состояла в анализе способности штаммов холерных вибрионов разных серогрупп, выделенных из различных источников и с разной эпидемической

значимостью (наличие/отсутствие генов *ctx AB* и *tcpA*), гидролизовать ПАВ.

Материалы и методы. В работе использовали: 6 штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор (*ctx+* *tcp+*), 6 дефектных по синтезу токсина и токсинорегулируемых пилей штаммов ($\Delta ctx\Delta tcp$), выделенных из воды поверхностных водоемов, 12 штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы, из которых 6 (*ctx+* *tcp+*) были выделены из клинического материала, а 6 атоксигенных ($\Delta ctx\Delta tcp$) – из проб воды поверхностных водоемов. Штаммы получали из музея живых культур ФКУЗ Ростовского НИПЧИ. Способность штаммов гидролизовать ПАВ (твины, первичные алкилсульфаты (SDS), спаны, синтетические моющие средства в концентрациях 0,1–4%) выявляли на сконструированных нами средах. Для выяснения способности холерных вибрионов использовать взятые в исследование субстраты в качестве единственного источника углерода использовали среду Бхаскарана.

Гидролиз многих ПАВ осуществляют ферменты эстеразы/липазы. В настоящее время показана роль ферментов, участвующих в деструкции ПАВ в метаболизме. Более того, их используют для дифференциации токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что все штаммы холерных вибрионов разных серогрупп, выделенные из различных источников и с разной эпидемиологической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctx AB* и *tcpA*), росли на сконструированных средах и обладали способностью гидролизовать предложенные субстраты, что проявлялось в образовании вокруг макроколоний вибрионов зон различного диаметра через 24–72 ч инкубации при 37°C. Обнаружено, что состав сред, концентрация субстратов влияли на проявление исследуемой ферментативной активности. Показано, что ПАВ также могут использоваться холерными вибрионами в качестве единственного источника углерода. Таким образом, выявленная способность холерных вибрионов гидролизовать большое количество различных ПАВ может способствовать персистенции холерного вибриона в различных экологических нишах, наделяя его дополнительными стратегиями выживания.

Характеристика штаммов *Salmonella*, выделенных от людей и животных в Санкт-Петербурге в 2014–2016 гг.

Егорова С.А.¹, Кафтырева Л.А.¹, Войтенкова Е.В.¹, Забровская А.В.¹, Толузакова Н.В.², Черткова С.А.², Смирнова Е.В.², Жирнова Л.Ю.³, Уткина Н.П.³, Сихандо Л.Ю.³, Пеленко Т.Ф.³

¹ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», г. Санкт-Петербург;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербурге», филиал №4, г. Санкт-Петербург;

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербурге», филиал №6, г. Санкт-Петербург

Мониторинг чувствительности к антимикробным препаратам (АМП) штаммов *Salmonella*, выделенных от людей (434 штамма) и из пищевых продуктов животного происхож-

ждения (269 штаммов), проводимый в 2014–2016 гг. в Санкт-Петербурге, показал, что в популяции *Salmonella* сформировалась устойчивость к АМП, рекомендованным для лечения осложненных и тяжелых форм сальмонеллезов: фторхинолонам и цефалоспорином расширенного спектра (ЦРС). Среди штаммов, выделенных от людей, около 90,0% относились к трем сероварам: *S. enteritidis* (77,8%), *S. typhimurium* (6,9%) и *S. infantis* (4,5%), в то время как штаммы, выделенные из пищевых продуктов, характеризовались широким спектром сероваров (*S. typhimurium* – 23,0%; *S. infantis* – 17,1%; *S. derby* – 12,3%; *S. enteritidis* – 8,5%; *S. agona* – 4,8%). Большинство штаммов *S. typhimurium*, *S. derby*, *S. agona* выделены из продукции свиноводства; из продукции птицеводства выделяли преимущественно штаммы *S. enteritidis* и *S. infantis*. Наиболее часто отмечена устойчивость к фторхинолонам: у 26,0% штаммов, выделенных из пищевых продуктов, и 59,0%, выделенных от людей (такая резистентность характерна для сероваров *S. enteritidis* (66,7%) и *S. infantis* (88,2%)). Множественная устойчивость к АМП более характерна для штаммов, выделенных из пищевых продуктов, чем от людей (41,6 и 15,8% соответственно), причем наиболее высока доля таких штаммов в сероварах *S. typhimurium* и *S. infantis* (65,4% и 82,4% соответственно). Из отечественной и импортной свинины были выделены штаммы *S. typhimurium*, имеющие профиль множественной резистентности к АМП, характерный для *S. typhimurium* фаговара 104 – возбудителя крупных вспышек сальмонеллезов в странах Европы, США и Канаде в 1980–2000 гг. Устойчивость к ЦРС выявлена у 2,9% штаммов различных сероваров, выделенных от людей (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. coeln*, *S. dublin*, *S. newport*, *S. virchow*), причем большинство продуцируемых бета-лактамаз расширенного спектра относились к генетическому семейству CTX-M. Из пищевых продуктов выделены штаммы *S. dublin* (1,0%), продуцирующие бета-лактамазу AmpC.

Формирование резистентности у штаммов *Salmonella* вызвано, в первую очередь, использованием АМП в сельском хозяйстве и ветеринарии. В этих условиях пищевые продукты животного происхождения выступают в роли факторов передачи не только устойчивых штаммов *Salmonella*, но и детерминант резистентности к АМП, расположенных на мобильных генетических элементах.

Характеристика монофазных штаммов *Salmonella* группы В: 1,4,[5],12:i:–

Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Войтенкова Е.В., Матвеева З.Н., Забровская А.В.

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», г. Санкт-Петербург

В конце 1990-х гг. в европейских странах от людей и животных стали выделять штаммы *Salmonella* серологической группы В (O 1,4,5,12), у которых отсутствовали Н-антигены первой или второй фазы (так называемые *S. typhimurium*-подобные штаммы). Наибольшую клиническую значимость и глобальное распространение получили штаммы *Salmonella*

с антигенной формулой 1,4,[5],12:i:– (отсутствует вторая фаза Н-антигена), которые в настоящее время занимают ведущее место в списке выделяемых сероваров сальмонелл: в 2015 г. в странах Евросоюза – третий по частоте выделения серовар (8,3%), в США и Канаде – пятый (около 5% штаммов). Такие штаммы вызывали крупные вспышки в различных странах. В 2006 г. в Люксембурге возникли две пищевые вспышки среди людей пожилого возраста (133 заболевших), где фактором передачи послужила свинина местного производства. В том же году зарегистрирована крупная вспышка в Германии. В 2010 гг. во Франции зарегистрированы две вспышки, связанные с употреблением свиных сосисок (90 заболевших) и импортной говядины (554 случая среди школьников). В США в 2007 г. возникла вспышка, охватившая несколько штатов, связанная с употреблением пирогов с мясом курицы. В странах Евросоюза штаммы *Salmonella* 1,4,[5],12:i:– выделяют из различных источников: от людей, сельскохозяйственных животных, из мясных продуктов и кормов. Штаммы *Salmonella* 1,4,[5],12:i:– представляют гетерогенную группу, принадлежат к различным фаготипам (193, 120, 12, 18, 208, 191а и др.) и генотипам, характеризуются различными профилями резистентности и относятся к нескольким клональным линиям. Для штаммов *Salmonella* 1,4,[5],12:i:– характерно наличие множественной устойчивости к антимикробным препаратам: ампициллину, стрептомицину, сульфаниламидам и тетрациклину. В 2015 г. около 80,0% штаммов, выделенных в странах ЕС, более 50,0% – в США и Канаде характеризовались таким фенотипом резистентности. Идентификация штаммов *Salmonella* 1,4,[5],12:i:– связана с определенными трудностями, поскольку подтверждение отсутствия Н-антигена удлиняет время исследования. Кроме того, отрицательные результаты, полученные в реакции агглютинации на стекле, не исключают возможность того, что штамм имеет другой Н-антиген второй фазы (не Н 1,2): например, 1,5 (S. Lagos), 1,6 (S. Agama), e,n,x (S. Farsta), e,n,z15 (S. Tsevie), l,w (S. Gloucester), z6 (S. Tumodi). Достоверно доказать отсутствие Н-антигена и дифференцировать *S. typhimurium* и сальмонеллы группы В других сероваров от монофазного варианта можно только молекулярно-генетическими методами.

Мониторинг резистентности возбудителей туберкулеза и микобактериозов к воздействию дезинфицирующих средств

Еремеева Н.И., Канищев В.В., Вахрушева Д.В., Умпелева Т.В., Белоусова К.В., Лавренчук Л.С.

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии», г. Екатеринбург

Согласно «Национальной концепции профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи», мониторинг резистентности микроорганизмов к дезсредствам (ДС) должен проводиться на регулярной основе.

Цель. Проведение мониторинга резистентности микобактерий к воздействию ДС.

Материалы и методы. 33 культуры *M. tuberculosis* генотипов *Beijing*, *LAM*, *Ural*, выделенные от пациентов; 12 культур

M. tuberculosis, выделенных с поверхностей объектов противотуберкулезного стационара; 2 культуры нетуберкулезных микобактерий *M. fortuitum* и *M. avium*; 2 музейные культуры *M. terrae* и *M. tuberculosis H₃₇Rv*.

Разрешенные к применению в России ДС, имеющие туберкулоцидные режимы применения: на основе катионных поверхностно-активных веществ – 11 ДС; кислородсодержащие – 7 ДС; хлорсодержащие – 2 ДС и альдегидсодержащие – 2 ДС.

Оценку резистентности микобактерий к воздействию дезинфицирующих средств осуществляли согласно методике, изложенной в МУ 3.5.2596-10

Результаты. Все культуры проявили устойчивость к воздействию 85,7% туберкулоцидных режимов ДС на основе КПАВ, к 90,9% кислородсодержащих ДС, к 100% альдегидсодержащих и хлорсодержащих ДС. Повышение концентрации растворов и увеличение времени воздействия для некоторых ДС обеспечивало полное уничтожение микобактерий. Это свидетельствует о том, что действующие вещества, входящие в состав ДС, могут инактивировать все включенные в исследование микобактерии, а испытанные режимы не достаточны для осуществления данной задачи.

Выводы. Возбудители туберкулеза и микобактериозов проявили высокую устойчивость к воздействию туберкулоцидных режимов испытанных ДС. В связи с этим для осуществления мер, направленных на сдерживание селекции микобактерий, устойчивых к ДС, необходим мониторинг резистентности клинических и госпитальных изолятов микобактерий к ДС. В свою очередь, выявление микобактерий с устойчивостью к применяемым туберкулоцидным режимам ДС, в конкретном лечебно-диагностическом учреждении может служить маркером эпидемиологического неблагополучия, т.к. свидетельствует о неэффективности дезинфекции в отношении реально циркулирующих возбудителей.

Глобальное распространение штаммов *Salmonella typhimurium* фаготипа 104

Забровская А.В., Егорова С.А., Кафтырева Л.А.

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», г. Санкт-Петербург

С 1980-х гг. во многих странах мира отмечено эпидемическое распространение полирезистентных штаммов (multidrug resistant-MDR) *S. typhimurium* фаготипа 104 (так называемые MDR *S. typhimurium* DT104), характеризующихся устойчивостью к ампициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, сульфаниламидам и тетрациклину (фенотип ACSSuT). Впервые такие штаммы были выделены в Великобритании от людей, сельскохозяйственных животных и птиц. С 1996 г. *S. typhimurium* DT104 появилась в США и Канаде, в дальнейшем отмечено распространение этого возбудителя в странах Южной Америки, Африки и Европы. Крупные международные вспышки, связанные с употреблением говядины, вызванные штаммами MDR *S. typhimurium* DT104, зарегистрированы в странах Европы в 2001 г. (Швеция, Норвегия, Германия, Великобритания) и 2005 г. (Норвегия, Дания,

Нидерланды, Соединенное Королевство). Множественная резистентность штаммов *S. typhimurium* DT104 обусловлена генами, входящими в состав двух интегронов 1 класса, расположенных на хромосомном локусе (размером 12,5 kb), строение которого практически идентично у всех штаммов MDR *S. typhimurium* DT104 независимо от источника или страны выделения. С 1992 г. отмечено расширение спектра резистентности MDR *S. typhimurium* DT104 за счет устойчивости к триметоприму и ципрофлоксацину. В настоящее время в странах Европы отмечена тенденция к снижению случаев заболеваний, вызванных *S. typhimurium* DT104, однако этот возбудитель продолжает оставаться актуальным для здравоохранения. В США 18,6% штаммов *S. typhimurium* обладают фенотипом множественной резистентности, характерным для фаготипа 104 (ACSSuT). В Канаде в популяции *S. typhimurium* отмечена высокая доля штаммов с множественной резистентностью (от 4 до 54% в зависимости от провинции).

В России *S. typhimurium* занимает второе место в перечне наиболее часто выделяемых сероваров сальмонелл, но данных о выделении штаммов фаготипа 104 нет, поскольку для лабораторий недоступен типовой набор бактериофагов Международной схемы фаготипирования, используемый для детекции данного фаготипа в странах Евросоюза. Тем не менее, на территории Северо-Западного федерального округа в последние годы от сельскохозяйственных животных нередко выделяют полирезистентные штаммы *S. typhimurium* с фенотипом резистентности, характерным для MDR *S. typhimurium* DT104, что позволяет предположить «завоз» штаммов данного фаготипа на территорию РФ.

Гармонизация микробиологических и паразитологических показателей эпидемической безопасности питьевой воды с международными требованиями

Загайнова А.В.¹, Кузнецова К.Ю.¹, Артемова Т.З.¹, Гипп Е.К.¹, Максимкина Т.Н.¹, Новожилов К.А.¹, Грицюк О.В.¹, Юдин С.М.¹, Журавлев П.В.², Алешня В.В.²

¹ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью», г. Москва;

²ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии», г. Ростов-на-Дону

В связи с переходом международной практики санитарно-гигиенического контроля объектов окружающей среды (ООС) на новые критерии оценки качества возникает необходимость их гармонизации с международными показателями.

Анализ международных источников свидетельствует о том, что внутренние национальные стандарты и руководства ряда евразийских и североамериканских государств, а также Европейские международные руководства в качестве основных показателей при определении качества вод различного назначения определяют: *E.coli*, как показатель недавнего фекального загрязнения; показатель «Колиформные бактерии» (coliforms) – принадлежность к семейству *Enterobacteriaceae* (определение по таксономическому признаку). В СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические тре-

бования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества» в качестве индикаторных показателей используются такие показатели, как термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ) и общие колиформные бактерии (ОКБ), которые определяются по аналогичному признаку.

В качестве нормируемого показателя качества водоподготовки и гигиенического состояния трубопроводов и водопроводов во всех вышеуказанных международных документах используется «технологический показатель» – количество колоний гетеротрофных бактерий (Heterotrophic plate count), в водном законодательстве РФ – общее микробное число (ОМЧ).

В стандартах безопасности питьевого водоснабжения некоторых государств (Австралия, Рекомендации ВОЗ) с целью контроля качества водоподготовки из поверхностных водоисточников на выходе из водопроводных станций определяются споры клостридий с идентификацией *Clostridium perfringens*, в России также определяется этот показатель (СанПиН 2.1.4.1074-01) – споры сульфитредуцирующих клостридий, но без идентификации *Clostridium perfringens*.

В Директивах 98/83/ЕС и 2000/60/ЕС, в Австралийском руководстве по контролю питьевой воды, нормируются «кишечные энтерококки» (Intestinal enterococci), которые рекомендованы российскими специалистами в качестве основного индикаторного показателя контроля качества питьевых вод при выборе водоисточника.

В стандарте по определению качества питьевой воды US EPA Drinking Water Standards (США), в Канадском руководстве по контролю питьевой воды (2012 г), в СанПиНе 2.1.4.1074-01 введены показатели цист лямблий и ооцист криптоспоридий (*Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts).

При выборе индикаторных микроорганизмов для оценки потенциальной эпидемической опасности водопользования учитывают закономерности вегетирования микроорганизмов в водной среде, что определяет сроки их выживаемости, которые должны быть не меньше таковых у возбудителей кишечных инфекций. Поэтому предлагаемые критерии санитарно-бактериологической оценки качества водопроводной воды по показателям из 3 биологических групп: бактериологические, вирусологические и паразитологические, обеспечивают высокую степень эпидемической безопасности водопользования населения. Эти показатели (ОМЧ, колиформные бактерии, *E. coli*, колифаги, споры сульфитредуцирующих клостридий, цисты лямблий) при соблюдении их нормативных уровней позволяют гарантировать с определенной степенью надежности отсутствие риска возникновения инфекционных заболеваний, ассоциированного с водным фактором передачи.

Перспективы разработки тест-системы с наночастицами коллоидного серебра для обнаружения *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в дот-иммуноанализе

Загоскина Т.Ю., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Андреевская Н.М., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Старикова О.А., Рык С.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск

Для выделения энтеропатогенных иерсиний (*Yersinia pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) используют трудоемкий и длительный по времени бактериологический метод. Однако возбудитель в объектах окружающей среды выявляется редко, что исключает возможность мониторинга за распространением иерсиний, снижая эффективность лабораторной диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Предлагаемые ранее диагностические методы для обнаружения антигенных детерминант *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* на основе гемагглютинации (РНГА), агглютинации (РКоА, ЛА), твердофазного иммунохимического метода (ИФА) в практике лабораторной службы не получили широкого распространения ввиду нестабильности выпускаемых серий препаратов и отсутствия сертифицированных тест-систем, несмотря на их эффективные диагностические возможности. Молекулярно-генетические методы (ПЦР), направленные на обнаружение специфической ДНК *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, характеризующиеся быстрой и достоверностью получаемых результатов, показали положительный опыт применения в клинической и эпидемиологической диагностике псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Однако эти методы используются только в специально оборудованных лабораториях.

Сконструированная нами тест-система для дот-иммуноанализа (ДИА) с применением специфических антител, меченных наночастицами коллоидного серебра, позволяет в экспериментальных условиях обнаруживать штаммы *Y. pseudotuberculosis* O:1b и *Y. enterocolitica* O:3 и O: 9 в концентрации 5×10^5 м.к./мл⁻⁸ $\times 10^6$ м.к./мл (100–1000 м.к. в пробе). При этом не наблюдалось перекрестного реагирования с гетерологичными микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae*. Метод характеризуется простотой постановки, миниатюризацией (1 мкл), экспрессностью (не более 2 ч), отсутствием потребности в ридерах и других дорогостоящих приборах, достаточно высокой специфичностью и чувствительностью (сравнимая по своей эффективности с ПЦР). Это делает ДИА перспективным для экспресс-индикации и ускоренной идентификации *Y. pseudotuberculosis* и патогенных *Y. enterocolitica* в лабораториях практического здравоохранения и полевых формирований Роспотребнадзора при проведении микробиологического мониторинга.

Диагностические возможности тест-системы иммуноферментной для выявления антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза

Замарина Т.В., Храпова Н.П.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», г. Волгоград

Одним из актуальных направлений лабораторной диагностики мелиоидоза остается создание тест-систем для обнаружения *Burkholderia pseudomallei* в различных объектах исследования. Использование моноклональных антител (МКА) в качестве основы для изготовления компонентов иммунобиологических препаратов значительно увеличивает специфичность и чувствительность диагностических реагентов. В Волгоградском противочумном институте была разработана тест-система иммуноферментная на основе МКА к капсульному гликопротеину 200 kDa, основному маркеру вирулентных штаммов *B. pseudomallei*. Целью работы явилась оценка диагностических возможностей тест-системы иммуноферментной.

Тест-система, предназначенная для обнаружения антигена 200 kDa в сэндвич-варианте ТИФМ, сконструирована по следующей схеме: АТ₁+АГ+АТ₂ (ИПК). В качестве антител первого порядка (АТ₁), адсорбируемых на планшете, использовали смесь из трех вариантов МКА (3С₆+5С₂+2А₆) в суммарной концентрации 20 мкг/мл. ИПК (АТ₂) готовили на основе МКА 5С₂. Оптимальная концентрация смеси МКА, направленных к различным эпитомам гликопротеина капсулы *B. pseudomallei*, обеспечивала наибольшую чувствительность реакции.

Проверка чувствительности в реакциях с различными образцами гликопротеина капсулы высоковирулентного штамма *B. pseudomallei* 100 показала, что минимальная выявляемая концентрация активного вещества составила 2,5 мкг/мл. Установлено, что тест-система позволяет выявлять различия в качестве серий образцов гликопротеина капсулы возбудителя мелиоидоза.

Подтверждена пригодность тест-системы для анализа водно-солевых экстрактов (ВСЭ) антигенов капсулообразующих буркхольдерий II–III групп патогенности (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. septicum*) с точки зрения содержания гликопротеина 200 kDa. Чувствительность выявления антигена в ВСЭ гетерологичных микроорганизмов была значительно ниже, чем у гомологичных штаммов.

Исследование ВСЭ и экстрацеллюлярных экстрактов (ЭЦА) возбудителей сапа и мелиоидоза показало, что содержание антигена 200 kDa в ЭЦА выше, чем в ВСЭ клеток буркхольдерий, что соответствует данным зарубежных исследователей.

В результате проведенного исследования были получены доказательства эффективности применения экспериментальной тест-системы для выявления патогенных буркхольдерий в различных пробах.

Грамположительная бактериемия у терапевтических больных

Каргальцева Н.М.¹, Борисова О.Ю.¹, Кочеровец В.И.²

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского», г. Москва;

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, г. Москва

В общепринятой практике микробиологическая диагностика бактериемии широко применяется при сепсисе и септических состояниях. Однако бактериемия развивается как осложнение и при терапевтических заболеваниях. Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания в 30–40% случаев является результатом действия бактериемии, диагностика которой в руководящем документе не предусмотрена. Подобным образом дело обстоит с ревматизмом и осложнениями при диализной терапии.

Была поставлена задача – выявление бактериемии у терапевтических госпитальных и амбулаторных больных с разными диагнозами и хроническими заболеваниями.

У 786 обследованных госпитальных больных кардиологического профиля бактериемия была верифицирована в 37,5%, а у 276 амбулаторных пациентов – в 55,4% случаев. Кровь госпитальных больных засеивалась в завальцованные анаэробные флаконы с сердечно-мозговой средой лабораторного приготовления. Кровь амбулаторных пациентов исследовалась согласно патенту экспресс-методики диагностики бактериемии, при которой посевным материалом служил лейкоцитарный слой пробы крови, засеиваемый на аэробный и анаэробный гемагар с соответствующими условиями культивирования.

Современный и научный подход к микробиологическому исследованию крови позволил выделить 472 штамма у госпитальных больных, которые состояли из аэробных (89,6%) и анаэробных бактерий (9,1%) и грибов (1,3%). Из аэробов ведущими микроорганизмами были грамположительные кокки (71,6%), а из анаэробов – грамположительные бесспорные палочки (72,0%). Полимикробная бактериемия составляла 16,9%. Из гемокультур амбулаторных пациентов выделили 248 штаммов микроорганизмов, относящихся к аэробам (71,0%), анаэробам (27,0%) и грибам (2,0%). Среди аэробов лидировали грамположительные кокки (61,9%), а среди анаэробов – грамположительные палочки (92,5%). Полимикробная бактериемия была выявлена в 36,6% случаев. У госпитальных больных бактериемию чаще диагностировали у больных ревматизмом (42,0%) и миокардитом (39,5%), а у амбулаторных пациентов – при осложнениях после пластической хирургии (100,0%) и стоматологических заболеваниях (55,6%).

Унифицированный подход к микробиологическому исследованию крови диагностировал бактериемию при терапевтической патологии у госпитальных и амбулаторных больных. Выявленная бактериемия с ее грамположительной особенностью (86,7% и 85,1% соответственно) позволит назначать целевую антимикробную терапию.

Новые подходы к лабораторной диагностике легионеллеза

Карпова Т.И.¹, Мариненко О.В.¹, Дронина Ю.Е.¹, Яцышина С.Б.², Тартаковский И.С.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи», г. Москва;

²ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», г. Москва

Болезнь легионеров – тяжелая острая пневмония, для которой описаны спорадические случаи и вспышки, в том числе и внутрибольничные. Несмотря на проводимое этиотропное лечение смертность может достигать 10–12%, а при внутрибольничных вспышках – 30–40%.

Современные подходы к лабораторной диагностике легионеллеза должны строиться на дифференцированном подходе к диагностике внебольничных тяжелых пневмоний, к легочным осложнениям у пациентов со сниженным иммунитетом (как правило, внутрибольничных пневмоний) легионеллезной этиологии, к разработке специальных алгоритмов микробиологических исследований для каждой группы.

Для диагностики легионеллеза при тяжелых внебольничных пневмониях предложено сочетание бактериологического метода (bronхоальвеолярный лаваж (БАЛ), биопсия, мокрота) и экспрессного иммунохроматографического теста для мочи, позволяющего за 30 мин установить и подтвердить окончательный диагноз легионеллезной инфекции, вызванной *L. pneumophila* серогруппы 1.

При тяжелых пневмониях экспресс-диагностика легионеллеза, основанная на определении антигена в моче, была невозможна у пациентов с острой или хронической почечной недостаточностью, у которых наблюдалась олиго-либо анурия. Кроме того, у больных со сниженным иммунитетом серьезную опасность могут представлять также *L. pneumophila* других серогрупп и других видов *Legionella spp.* В связи с этим алгоритм был дополнен исследованием жидкости БАЛ методом ПЦР-РВ. Параллельно с этим применяли бактериологический метод – посев БАЛ на среду для легионелл.

Применение разработанного алгоритма позволило установить диагноз легионеллезной этиологии у 12 из 114 обследованных гематологических больных (10,5%). Диагноз был установлен бактериологически в результате выделения культуры *L. pneumophila* из жидкости БАЛ.

Полученные результаты подтверждают важное значение ПЦР-диагностики легионеллеза у иммунокомпрометированных пациентов с острой дыхательной недостаточностью. Выигрыш во времени до 3–4 сут по сравнению с бактериологическим анализом БАЛ может быть определяющим для успешной антибиотикотерапии и исхода болезни.

Идентификация *Comamonas kerstersii* в составе микробиоты кишечника человека

Кафтырева Л.А.^{1,2}, Войтенкова Е.В.¹, Матвеева З.Н.¹, Зуева Е.В.¹, Сужаева Л.В.¹, Забровская А.В.¹

¹ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», г. Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова», г. Санкт-Петербург

В группе неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов в 1985 г. в отдельный род были выделены бактерии *Comamonas* (один вид) – *Comamonas terrigena*. В настоящее время этот род насчитывает 17 видов. В практических лабораториях видовая идентификация представителей семейства *Comamonadaceae* при использовании рутинных фенотипических тестов затруднена из-за необходимости изучения значительного количества ферментативных свойств тестами, не всегда доступными бактериологическим лабораториям. Обычно выделенные штаммы идентифицируют до рода *Comamonas*. Известно, что бактерии этого рода широко распространены в объектах окружающей среды (заболоченная почва, вода открытых водоемов и др.). В последние годы появились сообщения, свидетельствующие о способности представителей двух видов, *Comamonas kerstersii* и *Comamonas testosteroni*, вызывать гнойно-септические инфекции (ГСИ) у человека: бактериемию, перитонит, аппендицит, послеоперационные осложнения и др. В течение двух лет (2015–2016 гг.) при изучении качественного и количественного состава микробиоты кишечника взрослых людей (более 2000 проб испражнений) в двух пробах были выделены грамотрицательные, каталазо- и оксидазоположительные, подвижные, неферментирующие глюкозу бактерии (среда Эндо). Видовую идентификацию проводили, используя рутинные биохимические тесты, тест-систему «НЕФЕРМ тест 24» (ЭрбаРус, Россия), бактериологический анализатор VITEC 2 Compact (BioMerieux, Франция), MALDI-ToF масс-спектрометр Microflex (Bruker Daltonics). Рутинные биохимические тесты позволили отнести эти микроорганизмы к грамотрицательным неферментирующим бактериям (ГНФБ). Идентификация с использованием тест-системы «НЕФЕРМ тест 24» и карты GN (VITEC 2 Compact) показала, что оба штамма относятся к *C. testosteroni*. Другие виды *Comamonas* не могли быть идентифицированы данными методами, поскольку фенотипическая характеристика остальных видов не представлена в базах данных этих методов. Изучение этих штаммов методом времяпролетной масс-спектрометрии позволило их идентифицировать как *C. kerstersii* (score более 2,0). Эти штаммы обладали устойчивостью к антимикробным препаратам.

Наши данные свидетельствуют, что штаммы *C. kerstersii* регистрируются редко, поскольку идентификация, основанная на фенотипических методах, не позволяет их дифференцировать от других видов *Comamonas*. Масс-спектрометрия MALDI-ToF является пока единственным методом быстрой и точной идентификации видов (родов), включенных в группу неферментирующих грамотрицательных бактерий.

Лабораторная диагностика брюшного тифа

Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Войтенкова Е.В.

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», г. Санкт-Петербург;

Референс-центр по мониторингу за возбудителями брюшного тифа

В референс-центр в 2005–2017 гг. поступили для реидентификации 290 штаммов *S. typhi*, выделенных в бактериологических лабораториях от заболевших брюшным тифом, зарегистрированных на 19 территориях РФ (в Санкт-Петербурге, Архангельской, Воронежской, Иркутской, Калининградской, Кемеровской, Кировской, Ленинградской, Московской, Новгородской, Орловской, Рязанской, Смоленской, Тульской, Томской, Ульяновской областях, Хабаровске и Еврейской АО, Ханты-Мансийском АО). Диагноз брюшного тифа был подтвержден выделением чистой культуры возбудителя из проб биологического материала: крови (47,4%), испражнений (49,5%), мочи (1,7%) и других (1,4% – секционный материал, выпот из брюшной полости). Штаммы хорошо росли на применяемых для *Enterobacteriaceae* простых, селективных и дифференциально-диагностических питательных средах отечественных производителей, представленных на рынке РФ, давая характерные для возбудителя брюшного тифа колонии; имели типичные культурально-ферментативные свойства: ферментировали с образованием кислоты глюкозу, маннит, мальтозу, сорбит. Отсутствие газообразования и продукции сероводорода на полиуглеводных средах, а также неспособность утилизировать цитрат в среде Симмонса являлись характерными признаками *S. typhi*. Практически все штаммы принадлежали к ферментативному биовару 1, за исключением двух, которые относились к биовару 2. Все штаммы обладали хорошо развитым Vi-антигеном, при этом из них 5,5% находились в V-форме (были O-инагглютинабельными). Все штаммы были подвижны и имели Hd антиген. Перечисленные особенности ферментативной характеристики и антигенной структуры не вызывали затруднений отнесения штаммов к серологическому варианту – *S. typhi*.

В популяции *S. typhi* преобладали штаммы, устойчивые к хинолонам: 72,9% с устойчивостью низкого уровня (минимальная подавляющая концентрация (МПК) ципрофлоксацина 0,12–0,5 мг/л), 4,9% – с устойчивостью высокого уровня (МПК от 6,0 до 32,0 мг/л и более). Рекомендовано определять чувствительность штаммов *S. typhi* к фторхинолонам диско-диффузионным методом, используя диск с пefлоксацином, 5 мкг ($S \geq 24$ мм), или методами определения МПК ципрофлоксацина ($S \leq 0,06$ мг/л). Несмотря на то, что в РФ заболеваемость брюшным тифом носит спорадический характер, сформировалась и стала реальной проблемой резистентность возбудителя к фторхинолонам, активно используемым в последние годы для лечения брюшного тифа, что делает невозможным применение их для эмпирической терапии этой инфекции в нашей стране.

Получение аутопробиотического продукта на основе лактобактерий – современная инновационная технология

Кириленко М.А., Дмитриева Ж.М., Кузнецов О.Ю.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», г. Иваново

В настоящее время существует множество препаратов для лечения и восстановления нарушений нормальной микрофлоры кишечника. Однако разработка пробиотиков активно продолжается, и исследования в этом направлении являются весьма перспективными для обеспечения человека новыми корректирующими микробиоценоз кишечника биологическими препаратами. К сожалению, с расширением спектра показаний для назначения пробиотиков накапливается информация, что положительный эффект препаратов, даже при длительном применении, нередко носит временный характер либо полностью отсутствует. Поэтому лучший эффект достигается при индивидуальном подборе донорских штаммов или использовании аутофлоры. Все это служит основанием для разработки концепции создания пробиотиков и продуктов функционального питания на основе современных инновационных технологий получения аутоштаммов и аутоассоциаций симбиотических микроорганизмов, так называемых аутопробиотиков.

Нами были выделены аутоштаммы лактобактерий [Сафонова М.А., Кузнецов О.Ю. и др., 2014] в виде естественного комплекса кишечника человека путем деконтаминации содержимого кишечника от посторонней микрофлоры за счет многократных разведений исследуемого материала жидкой питательной средой MRS, пригодной для выделения и культивирования лактобактерий. Последующее удаление аллотонной микрофлоры происходило путем добавления к биоматериалу, разведенному до 10^{-6} , слюны того же индивидуума (у которого был взят образец кишечного содержимого), далее его инкубировали в течение 48 ч при 38°C. После проверки при отсутствии посторонней микрофлоры проводили дальнейший пересев полученной биомассы на жидкие питательные среды для накопления биомассы лактобактерий без добавления селективных агентов. Выделенный по данному способу аутопробиотический комплекс используется для приготовления молочнокислого продукта, содержащего живые лактобактерии. Этот продукт может применяться для профилактики и лечения дисбактериоза и заболеваний, связанных с нарушениями нормальной микрофлоры кишечника у человека.

Микрокультивирование лактобактерий как способ оценки их биосовместимости

Кириленко М.А., Еронова А.Е., Кузнецов О.Ю.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», г. Иваново

Микрокультивирование бактерий подразумевает использование для данного процесса микроскопических камер с размещенными в них культурами бактерий. Их прижизнен-

ное наблюдение выполняется с помощью фазового контраста в световом микроскопе. В качестве объекта исследования нами были выбраны бактерии рода *Lactobacillus* различных видов. В работе использовали *L. acidophilus* (лактобактерин) – основная исследуемая культура, тест-культуры эффективных штаммов лактобактерий, входящие в состав йогуртов «Иммунеле», – *L. rhamnosus* и *L. casei*, «Актимель» – *L. casei* DN-114001 defensis, Био баланс – *L. rhamnosus* LGG и пробиотический штамм *L. acidophilus* NK 1. Для культивирования лактобактерий методически нами было обосновано и апробировано использование микроскопических камер диффузного типа (Кузнецов О.Ю. и др., 1990), позволяющих выполнять совместное, но визуально разделенное культивирование различных штаммов микроорганизмов. Данный подход к исследованию биосовместимости и антагонизма пробиотических штаммов лактобактерий позволяет получить объективные данные об их адаптационных свойствах. Полученные данные позволяют говорить о наличии высокой антагонистической активности штамма *L. rhamnosus* LGG в условиях совместного микрокультивирования, под действием которого время генерации второго поколения *L. acidophilus* существенно увеличилось (с 123 ± 3 мин в контроле до 212 ± 3 мин). Обнаружено среднее антагонистическое воздействие штамма *L. acidophilus* NK1 (161 ± 4 минут), низкое *L. rhamnosus* и *L. casei* (143 ± 2 мин), а *L. casei* DN-114001 defensis (129 ± 2 мин) не оказывает никакого влияния на развитие клеток тестируемого штамма *L. acidophilus* в ходе совместного микрокультивирования. Таким образом, данные штаммы являются полностью биосовместимыми и могут выращиваться совместно при масштабировании биотехнологических процессов. Полученные результаты свидетельствуют, что метод совместного микрокультивирования лактобактерий позволяет достаточно быстро и на количественном уровне оценивать биосовместимость изучаемых штаммов бактерий и прогнозировать их совместное культивирование в биотехнологических процессах.

Использование метода MALDI TOF для сертификационного контроля молочнокислого продукта на основе живых аутопробиотических микроорганизмов

Кириленко М.А., Кузнецов О.Ю.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», г. Иваново

Преимущества MALDI TOF масс-спектрометрии перед традиционными методами микробиологических исследований в настоящее время уже неоспоримы. Это в первую очередь высокая чувствительность, относительная простота получаемых масс-спектров, высокая скорость измерения, возможность автоматизации и роботизации всех стадий исследования, а также быстрое получение окончательных данных как для идентификации микроорганизмов, так и для обнаружения биологически активных веществ, которые они продуцируют. Наши исследования показали, что при выполнении метода MALDI TOF возможно сравнить готовый мо-

лочнокислый продукт с исходным биотехнологическим сырьем. Такое сопоставление получаемых спектров молекулярной массы фрагментов макромолекул (МФМ) позволяет выполнить заключительный (сертификационный) контроль степени чистоты (отсутствие контаминации посторонней микрофлорой) и соответствия готового продукта, который получается в ходе биотехнологического процесса при использовании определенных микроорганизмов.

Нами была выполнена работа по оценке возможности использования метода MALDI TOF в заключительном контроле качества аутопробиотического препарата, содержащего комплекс живых лактобактерий. В ходе работы сравнивали полученные комплексы лактобактерий аутопробиотических штаммов до культивирования в молоке и готового молочнокислого продукта при использовании метода MALDI TOF на матрице α -циано-4-гидроксикоричной кислоты. При проведении сравнительного исследования комплексов лактобактерий обнаружено достоверное совпадение спектров МФМ. Сравнительная оценка спектров МФМ MALDI TOF среды культивирования (молоко) и готового продукта позволяет быстро установить отсутствие контаминации посторонней микрофлорой, подтвердить наличие именно аутопробиотических штаммов лактобактерий, определить степень готовности молочнокислого продукта.

Метод MALDI TOF показал возможность быстрого и надежного определения степени совпадения спектров и чистоты комплексов для сертификационного контроля получаемых индивидуальных молочнокислых продуктов на основе аутопробиотических микроорганизмов.

Масштабирование процесса приготовления молочнокислого аутопробиотического продукта

Кириленко М.А., Кузнецов О.Ю.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», г. Иваново

Производство молочнокислых продуктов, используемых для коррекции и восстановления нормальной микрофлоры кишечника при дисбактериозе, несомненно, является важным биотехнологическим процессом. Особенно это важно в случае получения продуктов, содержащих живые аутопробиотические штаммы.

Первоначально необходимо выделить данный аутопробиотический комплекс (АПК) штаммов. Нами предложен способ получения аутопробиотика [Сафонова М.А., Кузнецов О.Ю. и др., 2014]. После выделения данного комплекса следует этап получения готового продукта, и в данном случае возникает чрезвычайно важный вопрос сохранения качества и количества исходного инокулята, заселяемого в биотехнологическое сырье (цельное молоко без антибиотиков), АПК штаммов лактобактерий. Комплекс живых лактобактерий фасуется в равных объеме (1 мл) и концентрации микроорганизмов (не менее 10^7 КОЕ/мл) в стерильные ампулы и замораживается (-20°C) для приостановки физиологических процессов. Для получения готового молочнокислого продукта содержимое одной из ампул помещали в молоко без

предварительного размораживания и затем инкубировали при температуре $+37^\circ\text{C}$ в течение 8–10 ч для накопления биомассы.

После получения готового молочнокислого продукта мы определяли количество лактобактерий (КОЕ/мл) при использовании криогенно сохраненного инокулята АПК. Установлено, что практически не наблюдалось изменений по количеству лактобактерий в готовых продуктах различных серий при использовании одного и того же инокулята. Нами установлена возможность длительного сохранения и последующего использования предварительно замороженного аутопробиотического комплекса штаммов живых лактобактерий.

Таким образом, при использовании криоконсервированного АПК возможно выполнить быстрое масштабирование объемов необходимого индивидуального молочнокислого продукта, что имеет важное значение для лечения и профилактики дисбактериоза кишечника.

Энтеробактерии – возбудители гнойно-септических инфекций в стационарах Санкт-Петербурга

Козлова Н.С.^{1,2}, Баранцевич Н.Е.², Косякова К.Г.^{1,3}, Каменева О.А.³, Баранцевич Е.П.²

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова», г. Санкт-Петербург;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», г. Санкт-Петербург;

³СПГБУЗ «Детская городская больница №22», г. Санкт-Петербург

Цель исследования – сравнительная оценка этиологии гнойно-септических инфекций (ГСИ) в стационарах двух районов Санкт-Петербурга.

Материалы и методы. За 6 мес 2015–2016 гг. из различного материала больных ГСИ стационаров двух районов Санкт-Петербурга были выделены 827 штаммов энтеробактерий. Первый (северный) стационар является многопрофильным с оказанием пациентам высокотехнологичной хирургической помощи, второй (южный) – районным. Идентификация штаммов проводилась по стандартным методикам.

Результаты. Анализ структуры материала больных ГСИ, из которого были выделены энтеробактерии, показал преобладание в обоих стационарах проб мочи и мокроты, совокупная доля которых в северном стационаре составила 57,0%, а в южном – 38,5%. Удельный вес прочих проб биоматериала от пациентов с признаками ГСИ (кровь, бронхоальвеолярный лаваж, отделяемое ран, выпот в брюшную полость) также был выше в северном стационаре, чем в южном (31,5 и 22,4% соответственно). В то же время в южном стационаре треть проб составил материал из нестерильных локусов с признаками колонизации – 34,1% против 8,2% в северном стационаре. При анализе спектра энтеробактерий – возбудителей ГСИ в двух стационарах были выявлены определенные отличия. В обоих стационарах наиболее распространенными возбудителями ГСИ оказались клебсиеллы и эшерихии, в то же время в северном стацио-

наре безусловно преобладали клебсиеллы (61,2%) с преобладанием *K. pneumoniae*, которая составила более половины среди выделенных в указанный промежуток времени энтеробактерий (60,0%). Эшерихии выделялись почти в 3 раза реже (24,3%), а удельный вес энтеробактера, сerratии, морганелл и протей был невелик и составил 5,8%, 3,1%, 2,6% и 2,4% соответственно. В южном стационаре преобладающими возбудителями ГСИ оказались эшерихии (36,6%), преимущественно *E. coli* (36,1%), реже встречались клебсиеллы (27,8%) и энтеробактеры (16,1%), гораздо более редкими были протей (4,9%), сerratии (3,9%), цитробактеры (2,9%) и гафнии (2,4%). В целом удельный вес клебсиелл в северном стационаре более чем в два раза превышал таковой в южном, в то время как доля эшерихий и энтеробактера в южном стационаре была в полтора и, соответственно, почти в три раза больше, чем в северном.

Выводы. Были выявлены различия в спектре энтеробактерий – возбудителей ГСИ в стационарах северного и южного районов Санкт-Петербурга, при этом в многопрофильном стационаре безусловно преобладали клебсиеллы (61,2%), преимущественно *K. pneumoniae* (60,0%), в районном – *E. coli* (36,1%).

Антибиотикорезистентность энтеробактерий в многопрофильном стационаре Санкт-Петербурга

Козлова Н.С.^{1,2}, Баранцевич Н.Е.²,
Баранцевич Е.П.², Варгасова В.С.¹

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова», г. Санкт-Петербург;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», г. Санкт-Петербург

Цель исследования – оценка антибиотикорезистентности энтеробактерий, выделенных в многопрофильном стационаре Санкт-Петербурга.

Материалы и методы. Методом серийных разведений в агаре Мюллер-Хинтона определена чувствительность к 13 антимикробным препаратам (АМП) 622 штаммов энтеробактерий, в том числе 381 клебсиелл и 151 *Escherichia coli*, выделенных из различного материала пациентов с гнойно-септическими инфекциями в 2015–2016 гг. в многопрофильном стационаре Санкт-Петербурга.

Результаты. Среди энтеробактерий преобладали антибиотикорезистентные культуры, удельный вес которых составил 87,9%. Все штаммы *Klebsiella pneumoniae*, энтеробактера и морганелл были устойчивы хотя бы к одному АМП. Чаще встречались штаммы, устойчивые к ампициллину (86,0%) и амоксициллин/клавуланату (72,2%), реже – к фторхинолонам (59,8–60,1%), цефалоспорином III (58,9%) и IV (56,9%) поколения. Треть выделенных культур (35,2%) была резистентна к пиперациллин/тазобактаму. Более половины изолятов (53,5%) были устойчивы к гентамицину, в то время как амикацин проявлял большую активность в их отношении (21,4% устойчивых штаммов). Был выявлен высокий удельный вес культур, устойчивых к карбапенемам, так, к эртапенему была резистентна почти треть выделен-

ных штаммов (31,3%), к меропенему – четверть (23,5%), наибольшую активность в отношении энтеробактерий проявлял имипенем (14,1% устойчивых штаммов). Большая часть карбапенемрезистентных культур была представлена *K. pneumoniae* (95,9%), и только 2,0% составили *E. coli*, также было выделено по одному устойчивому к карбапенемам штамму морганеллы, энтеробактера, протей и сerratии. Более двух третей выделенных культур (67,2%) составили полирезистентные штаммы, удельный вес которых был в два раза выше у клебсиелл (84,8%), чем у эшерихий (41,1%). Всего у энтеробактерий было выявлено 64 спектра антибиотикорезистентности, при этом наиболее распространенными оказались штаммы с одновременной устойчивостью ко всем 13 изученным препаратам (11,9%), большинство из которых составили клебсиеллы (98,6%).

Выводы. Среди энтеробактерий, выделенных в многопрофильном стационаре Санкт-Петербурга, преобладали антибиотикорезистентные культуры с высоким удельным весом полирезистентных штаммов. Распространение в стационаре штаммов энтеробактерий, особенно *K. pneumoniae*, устойчивых к карбапенемам, является опасным прогностическим признаком, свидетельствующим о значительном уменьшении эффективности препаратов этой группы в отношении заболеваний, вызываемых энтеробактериями.

Структура и функции диагностических микробных аллергенов

Королюк А.М.^{1,2}, Ленхерр-Ильина Т.В.³, Кривохиж В.Н.¹,
Кисличкин Н.Н.², Красильников И.В.²

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», г. Санкт-Петербург;

²ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток», г. Санкт-Петербург;

³Companies Dr. Lehnher GmbH, Switzerland

Цель данного сообщения: на примере туберкулезных аллергенов рассмотреть связь между молекулярной ультраструктурой этих иммунобиологических препаратов и их свойствами, в частности, специфической чувствительностью и индукцией нежелательных реакций организма.

В настоящее время в РФ при массовом скрининге на туберкулезную инфекцию применяют стандартный туберкулин PPD-L для известной кожной пробы Манту (ПМ), а с 2008 г. также используют аллерген туберкулезный рекомбинантный Диаскинтест (ДСТ). Активным началом ДСТ являются слитые воедино генно-инженерные ранние белки *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6-CFP10. Разработчики Диаскинтеста и продвигающие его фтизиатры утверждают, что этот «инновационный» препарат значительно превосходит по специфической чувствительности «старый» туберкулин (Аксенова В.А., 2014, 2016; Слогодская Л.В., 2011; Слогодская Л.В. и соавт., 2017., и др.). Однако анализ результатов практической работы на местах свидетельствует о том, что, в отличие от пробы Манту, этот тест пропускает или запоздало выявляет, по разным данным, от 15% до 30% случаев активного туберкулеза (Шилова М.В., 2014, 2015, 2016; Корецкая Н.М., 2015, 2016; Лозовская М.Э., 2014 и другие). В раннем периоде

первичной туберкулезной инфекции (РППТИ) пробы отрицательны у 90–97% детей (Шилова М.В., 2016; Овсянкина Е.С., 2015; Михеева И.В., 2016). Проба Манту в РППТИ, напротив, положительна почти у 100% инфицированных детей. Опоненты ПМ объясняют это «неспецифичностью» препарата.

Авторы полагают, что природа описанных выше казусов становится очевидной после внимательного сравнения различий в структуре гибридной молекулы CFP-10/ESAT-6, описанной в авторском патенте RU 2360926 С9 на Диаскинтест (Киселев В.И., Пальцев М.А., 2009), и аналогичного природного комплекса, охарактеризованного Renshaw et al. (2005). Дело в том, что избыточные генноинженерные вставки и замены аминокислот в молекулах ESAT6 и CFP10, а также чрезмерно укороченная связь между ними в ДСТ существенно исказили природное взаимное расположение и молекулярный состав этих белков. Изменилась пространственная конформация важнейших эпитопов (их значение описано в работе Gey van Pittius et al., 2002), что могло снизить аффинность и avidность антигенных детерминант в ДСТ и, соответственно, уменьшить разрешающую способность аллергена выявлять гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ). Вероятно, для местной реакции на его введение в кожу требуется более продолжительный, чем для ПМ, срок стимуляции иммунной системы антигенами возбудителя туберкулеза и накопление очень значимых концентраций сенсибилизированных Т-клеток. Обычно это происходит уже в конце или после завершения латентного периода туберкулезной инфекции или в результате массивной контаминации *M. tuberculosis*.

Проба Манту лишена этих недостатков, так как туберкулин PPD-L содержит 20 небольших природных белков, в том числе ESAT6 и CFP10, которые по структуре и пространственному положению полностью идентичны аналогичным природным протеинам, вызывающим иммунный ответ в организме инфицированных людей.

Нежелательные побочные реакции после кожных аллергических проб также могут быть обусловлены особенностями ультраструктуры аллергенов. Год назад впервые появилась публикация о 5 случаях нерегламентированных реакций немедленного типа у детей после кожной пробы с ДСТ (Кривохиж В.Н., Королюк А.М., 2016). После этого в той же области РФ зарегистрировано еще более 40 таких реакций. Они развивались в промежутке от 1 ч до 12 ч после кожной пробы на ДСТ в виде местных, а также системных реакций: продолжительно повышенной температуры тела (до 39°C), обширного болезненного отека с гиперемией в области предплечья, иногда везикулезно-буллезных высыпаний. Через 72 ч в месте введения аллергена наблюдали умеренного размера папулу, окруженную большой зоной гиперемии. Проба Манту на другой руке при этом была умеренно положительной, иногда даже отрицательной. Есть сообщения из Самары о более тяжелых реакциях с признаками анафилаксии у взрослых (Бородулина Е.А.). Эти факты дополняют результаты обширных клинических испытаний препарата – тогда подобных реакций не выявили («Кожная проба с препаратом «Диаскинтест» – новые возможности идентификации туберкулезной инфекции», п/ред. М.А.Пальцева, М., 2011).

Возможно, в аллергене имеется скрытый потенциал для провокации серьезных немедленных процессов по типу ана-

филактических реакций III типа и/или антителонезависимых анафилактоидных реакций. Молекулярный вес комплекса ESAT6/CFP10 существенно выше, чем у любой из почти 200 гаптенных фракций стандартного туберкулина. Кроме того, в ДСТ концентрация указанных белков в десятки (если не в сотни) раз больше, чем в туберкулине, поскольку в последнем случае их извлекают непосредственно из микобактерий. В одной дозе ДСТ содержится 0,2 мкг чистого протеина ESAT6/CFP10, а в аналогичной дозе туберкулина – 0,12 мкг всей совокупности около двух десятков разнообразных белков.

Известен случай передозировки в 2500 раз (!) туберкулина при постановке пробы Манту детям в 2014 г. в Приморском крае. Ни у кого из нескольких десятков детей не было опасных реакций. Вряд ли подобный «случайный эксперимент» с рекомбинантным туберкулезным аллергеном закончился благополучно. Полагаем, что для профилактики опасных побочных реакций на Диаскинтест целесообразно наблюдать пациентов не менее 15 минут после проведения проб и быть готовыми к борьбе с анафилакцией.

Чувствительность к антибактериальным препаратам нового возбудителя инфекционных болезней – *Photorhabdus spp.*

Косилова И.С., Домотенко Л.В.,
Дентовская С.В., Шепелин А.П.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск

Представители рода *Photorhabdus spp.*, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae*, являются почвенными микроорганизмами, симбионтами энтомопатогенных нематод семейства *Heterorhabditidae*. В последнее время установлена их роль в развитии различных инфекционных заболеваний человека. Несмотря на природную чувствительность к основным классам антибактериальных препаратов (АБП), в литературе появляются данные об их устойчивости к некоторым АБП.

Цель. Сравнить результаты определения чувствительности штаммов *Photorhabdus spp.* к АБП диско-диффузионным методом (ДДМ) при двух температурах 37°C и 25°C и на двух питательных средах.

Материалы и методы. Для постановки ДДМ использовали агар Мюллера-Хинтона II (ФБУН ГНЦ ПМБ, РУ № РЗН 2017/5962), а в качестве контроля – Mueller Hinton II Agar (BD), диски (BD) с АБП 20 наименований разных групп. Анализировали восемь штаммов из нашей коллекции, пять из которых патогенны для человека и относятся к виду *P. asymbiotica* и три непатогенных штамма *P. luminescens*.

Результаты учитывали через 18–20 ч инкубации, а для двух штаммов *P. luminescens* через 42–44 ч. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с Клиническими рекомендациями (версия 2015 г.).

Результаты. Влияние температуры на результаты тестирования наблюдали для трех штаммов *P. asymbiotica* и одного штамма *P. luminescens* при определении чувствительности к ампициллину, бензилпенициллину и амоксициллину/

клавулановой кислоте: при 25°C их регистрировали как устойчивые, а при 37°C как чувствительные. При определении чувствительности этих штаммов к остальным АБП зависимости результатов от температуры не наблюдалось, но регистрировалась устойчивость еще к некоторым АБП: для *P. asymbiotica* – к кларитромицину и цефокситину, а для штамма *P. luminescens* – к карбенициллину и ципрофлоксацину и умеренная резистентность к кларитромицину.

Для оставшихся четырех анализируемых штаммов (двух штаммов *P. asymbiotica* и двух штаммов *P. luminescens*) результаты определения чувствительности к АБП не зависели от температуры. Штаммы проявляли чувствительность к большинству АБП. Кроме этого, при обеих температурах один штамм *P. asymbiotica* обладал устойчивостью к амоксициллину/клавулановой кислоте, ампициллину, бензилпенициллину, карбенициллину, цефокситину и умеренную устойчивость к кларитромицину. Аналогично этому штамму вел себя другой штамм *P. asymbiotica*, но к кларитромицину он был устойчив. Штаммы *P. luminescens* обладали следующим спектром устойчивости: один из штаммов устойчив к амоксициллину/клавулановой кислоте, бензилпенициллину, кларитромицину и цефокситину, а другой обладал резистентностью к амоксициллину/клавулановой кислоте, бензилпенициллину, кларитромицину, ампициллину и карбенициллину.

При сравнении результатов, полученных на агаре Мюллер-Хинтон двух производителей, отмечено полное совпадение.

Вывод. Результаты тестирования показали, что штаммы *Photorhabdus spp.* могут быть устойчивы к ряду АБП, поэтому в процессе их выделения при инфекционных заболеваниях необходимо проводить определение чувствительности к антибактериальным препаратам.

База данных по биологическим и молекулярно-генетическим свойствам штаммов *Bacillus anthracis*, изолированных на территории Сибири и Дальнего Востока (1959–2013 гг.)

Кравец Е.В.¹, Дугаржапова З.Ф.¹, Такайшвили В.Е.¹, Иванова Т.А.¹, Чеснокова М.В.¹, Афанасьев М.В.², Балахонов С.В.¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск;

²ОГАУЗ «Иркутский областной консультативно-диагностический центр», г. Иркутск

Для анализа и прогнозирования ситуации по сибирской язве необходимы сбор и систематизация сведений о штаммах *Bacillus anthracis*. Изучены 39 штаммов *B. anthracis* с территории 11 субъектов азиатской части Российской Федерации, создана и зарегистрирована база данных «Биологические свойства штаммов *Bacillus anthracis*, изолированных на территории Сибири и Дальнего Востока» (свидетельство о государственной регистрации базы данных №2016620321 в Реестре баз данных от 10 марта 2016 г. Федеральной службы по интеллектуальной собственности).

Структура базы данных пополняется и состоит из двух условных модулей. В первый модуль включены паспортные

данные штаммов, результаты 16 основных индикаторных и идентификационных тестов лабораторной диагностики; оценки вирулентности для лабораторных животных; биохимические свойства по 23 дополнительным тестам. Культуры выделены из проб объектов окружающей среды и материала от животных (по 35,9%), клинического и патологического материала больных и умерших людей (28,2%). Большинство изолятов обладали типичными свойствами (89,7%), патогенностью (79,5%), умеренной вирулентностью (LD_{50} 20–100 спор) и содержали обе плазмиды токсино- и капсулообразования ($pXO1^+/pXO2^+$). По четыре (10,3%) штамма обладали только плазмидой токсинообразования ($pXO1^+/pXO2^-$) и были бесплазмидными ($pXO1^-/pXO2^-$).

Во втором модуле отражена молекулярно-генетическая характеристика штаммов. VNTR-анализ 37 штаммов по 15 вариабельным локусам показал гетерогенность популяции – 21 VNTR-профиль, 13 из них уникальные. Установлена связь с канонической группой A.Br.008/009, но с формированием отдельной линии из трех главных клоновых комплексов. Масс-спектрометрическим анализом и прямым секвенированием 34 штаммов доказана принадлежность выделенных культур к двум глобальным генетическим линиям – А и В.

Таким образом, показано, что выделенные на курируемой территории штаммы *B. anthracis* характеризуются незначительным разнообразием по биологическим и молекулярно-генетическим свойствам. Обновлено паспорта изученных штаммов.

Сведения из базы могут служить в качестве генетического маркера при расследовании спорадических и вспышечных случаев сибирской язвы и возможных актов биотерроризма на административных территориях. Внедрение базы будет способствовать сбору и систематизации сведений о биологических свойствах и генетическом профиле штаммов, составлению картосхем мест их выделения с использованием ГИС-технологий для совершенствования надзора за сибирской язвой.

Несколько приемов для достоверного определения этиологической роли «непатогенных» видов бактерий в развитии инфекционных процессов респираторного тракта

Краева Л.А.¹, Кунилова Е.С.¹, Сайнес Е.В.¹, Петрова И.С.², Бургасова О.А.³, Беспалова Г.И.⁴

¹ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», г. Санкт-Петербург;

²ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1», г. Москва;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», г. Москва;

⁴ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова», г. Санкт-Петербург

Этиологию острых воспалительных процессов верхних дыхательных путей, обусловленных условно-патогенными микроорганизмами, удается установить лишь в 20–30% слу-

чаев. Выделение из клинического материала стрептококков групп *anginosus* и *mitis*, моракселл и клебсиелл не может служить основанием для доказательства их причастности к развитию инфекционного процесса, что осложняет трактовку результата исследования.

Целью данной работы явилась разработка алгоритма микробиологического исследования материала при воспалительных процессах верхних дыхательных путей. Исследованию подлежали 60 штаммов *Moraxella catarrhalis*, 100 штаммов *Staphylococcus epidermidis*, 225 штаммов *Streptococcus spp.*, 34 штамма *Klebsiella spp.*, выделенных от лиц с острыми воспалительными процессами верхних дыхательных путей и здоровых лиц. В работе применяли бактериологические методы, методы выявления фенотипических и генетических маркеров вирулентности, математические методы обработки данных.

Установлено, что штаммы условно-патогенных бактерий, имеющие соответствующие механизму патогенеза гены вирулентности, характерные для каждого вида бактерий, в 2–4 раза чаще встречались у лиц с острой патологией в характерных местах локализации, чем у здоровых лиц. Тяжесть течения заболеваний и выраженность клинических проявлений статистически значимо зависели от наличия у штаммов, кроме генов вирулентности, факторов патогенности, выявляемых в фенотипических тестах.

В результате был разработан алгоритм исследования клинического материала, взятого у лиц с острыми воспалительными процессами верхних дыхательных путей, при котором после выделения чистой культуры бактерий и идентификации предлагается постановка полимеразной цепной реакции с праймерами на выявление соответствующих генов вирулентности, а при их наличии – постановка фенотипического теста для подтверждения вирулентности штамма. При наличии генетических и фенотипических маркеров вирулентности выделенный штамм бактерий может считаться этиологически значимым, что позволяет получать достоверный результат исследования.

Чувствительность бактерий к антифунгальным полиенам и препаратам группы азолов

Криворутченко Ю.Л., Постникова О.Н., Шевкопляс Л.А., Логадырь Т.А.

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского – ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», г. Симферополь

Преодоление микробной резистентности к антимикробным препаратам представляет собой важнейшую задачу медицины. Одним из ее аспектов является изучение влияния антимикотиков на бактерии. Сообщалось, что бактерии устойчивы к полиеновым антибиотикам из-за отсутствия в их мембранах эргостерола. Препараты группы азолов нарушают синтез эргостерола грибов путем ингибирования цитохром Р450-зависимых деметилаз. Считается, что азолы могут подавлять жизнедеятельность грампозитивных бактерий *Mycobacterium smegmatis*, *Streptomyces*, *Streptococcus*

pyogenes, стафилококков *S. aureus* и *S. epidermidis*, но не действуют на грамотрицательные бактерии, такие как *E. coli*. Целью исследования явилось изучение чувствительности клинических изолятов *E. coli* и *S. aureus* к антимикотикам из группы азолов флуконазолу, клотримазолу и итраконазолу, а также к полиеновым антибиотикам нистатину и амфотерицину В. Использовали 2 референс-штамма и 11 клинических изолятов *E. coli*, а также 1 штамм и 21 изолят *S. aureus*. Оценку чувствительности бактерий к антимикотикам проводили методом дисков, использовали критерии, предлагаемые для определения чувствительности к препаратам грибов рода *Candida*. В результате исследования было установлено, что все референс-штаммы бактерий устойчивы к амфотерицину В и чувствительны к остальным антимикотикам. К амфотерицину В были устойчивы все изоляты *E. coli* и 90,5% изолятов *S. aureus*. Около половины изолятов *E. coli* и *S. aureus* были чувствительны к нистатину ($45,5 \pm 15,85\%$ и $38,1 \pm 10,9\%$) и клотримазолу ($45,5 \pm 15,8\%$ и $47,6 \pm 11,2\%$ соответственно). Максимальную чувствительность эшерихии и стафилококки имели к итраконазолу – $70,0 \pm 15,3\%$ и $80,9 \pm 8,8\%$ изолятов соответственно. Чувствительность *E. coli* и *S. aureus* ко всем препаратам за исключением флуконазола достоверных различий не имела. Устойчивыми к флуконазолу были 73% изолятов *E. coli* и все изоляты *S. aureus* (W-критерий Вилкоксона, $p = 0,013$). Таким образом, изоляты *E. coli* проявили неожиданно высокую чувствительность к итраконазолу и существенную к клотримазолу и нистатину. Уровни их чувствительности к итраконазолу, клотримазолу, нистатину и их полная устойчивость к амфотерицину В были близки к показателям изолятов *S. aureus*.

Физиологическая реверберация бактериальных клеток на начальных этапах развития микроколоний

Кузнецов О.Ю.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», г. Иваново

После попадания бактериального инокулята на поверхность плотной питательной среды жидкость из привнесенного объема инокулята частично испаряется, а также впитывается в агар. В это время происходит случайная адгезия клеток на поверхности агаризованной питательной среды. В дальнейшем своем развитии клетки начинают активно размножаться, формируя скопления клеток – микроколонии, которые впоследствии, сливаясь, образуют многоуровневый слайд (био пленку). Формирование био пленки представляет собой один из важнейших этапов развития бактериальной популяции. Исследование пространственного расположения бактериальных клеток и учет их физиологической активности на данном этапе можно выполнить, только используя микрокамеры. При этом возникает вопрос – влияет ли начальное взаимное расположение клеток инокулята на поверхности плотной среды на скорость прохождения клеточного цикла отдельными клетками, другими словами, не могут ли клетки, «проснувшиеся» ранее других, оказать воздействие на соседние клетки как волновые ревербераторы,

заставляя их более активно включиться в клеточный цикл. Объектом исследования была бактериальная культура *Shigella flexneri* S из коллекции Simmons. После посева инокулята все находящиеся в поле зрения микроскопа клетки были подразделены на три группы: одиночные клетки, парные клетки и агрегаты. Наблюдение за данными группами клеток позволило установить, что время генерации I поколения одиночных клеток (94 ± 14 мин) было достоверно меньше, чем у клеток в других группах (150 ± 10 мин – парные клетки и агрегаты – 124 ± 17 мин). Во II поколении клеток достоверных отличий по времени генерации уже нет. Это может свидетельствовать о кворум-сенсинге даже на начальных этапах развития клеток. Однако нами были зафиксировано явление физического плана – дистантное влияние клеток друг на друга. Так, для одиночных клеток, которые первыми включились в циклы деления, было определено расстояние между ними и обнаружено, что они находились почти равноудаленно друг от друга на расстоянии 48 ± 16 мкм. Это говорит о наличии не только химического, но и волнового дистантного влияния бактериальных клеток друг на друга – явления физиологической реверберации.

Определение структурных особенностей генома штамма *Shigella sonnei*-2013, выделенного при вспышке дизентерии в Республике Абхазия в 2013 году

Кузнецова И.В., Васильева О.В.,
Волынкина А.С., Писаренко С.В.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт»,
г. Ставрополь

В конце ноября 2013 г. в г. Ткуарчал (Абхазия) была зафиксирована вспышка кишечной инфекции. Всего с 24.11.2013 г. по 20.12.2013 г. было зарегистрировано 1260 больных, в том числе 390 детей в возрасте до 14 лет. Причиной вспышки было бактериальное загрязнение водозабора на р. Геджирке, являющейся источником питьевого водоснабжения для города. Результаты лабораторных исследований показали, что этиологическим фактором заболевания явилась *S. sonnei*. Особенностью вспышки была реализация водного пути передачи инфекции, как правило, не являющегося основным для данного возбудителя.

Генетическое типирование исследуемого штамма осуществляли методом мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). Анализировали нуклеотидные последовательности фрагментов 7 консервативных генов «домашнего хозяйства»: *adk* – adenylate kinase, *fumC* – fumarate hydratase, *gyrB* – DNA gyrase, *icd* – isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase, *mdh* – malate dehydrogenase, *purA* – adenylosuccinate dehydrogenase, *recA* – ATP/GTP binding motif. В результате определен сиквенс-тип исследуемого штамма – ST-152, являющийся одним из распространенных для *S. sonnei*. Штаммы с ST-152 ранее выделялись в Германии в 2009 г. и в Китае в 2009–2010 гг., тогда как на территории РФ, согласно имеющейся в базе данных информации, ранее отсутствовали.

С помощью метода полногеномного секвенирования показана высокая степень сходства полученных контигов с по-

следовательностью хромосомы и плазмид А, В, С и Е штаммов *S. sonnei* 53G и *S. sonnei* Ss046. В геноме штамма *S. sonnei*-2013 обнаружены нуклеотидные последовательности 136 генов, расположенных на плазмиде рO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30). Следует отметить, что гены *toxВ*, *espP*, *katP*, *hlyA-D*, входящие в вирулентный регион плазмиды рO26-Vir, у исследуемого штамма отсутствуют, но имеются гены, регулирующие биосинтез пилей адгезии IV типа (*pilL-pilN*), которые являются одним из факторов патогенности, обеспечивая адгезию микроба к клеткам кишечного эпителия, абиотическим поверхностям и формирование биопленки. В результате проведенной молекулярно-генетической характеристики выявлены структурные особенности штамма *S. sonnei*-2013, обусловленные наличием фрагментов плазмиды вирулентности рO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30).

К вопросу возможной оптимизации выделения клинических штаммов *Helicobacter pylori* в лабораторных условиях

Кутлиева Г.Дж.¹, Элова Н.А.¹,
Сахибназарова Х.А.¹, Джуманиязов Дж.А.²

¹Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан;

²Республиканский научный центр хирургии им. В.Вахидова, Ташкент, Узбекистан

Практическое здравоохранение до сего времени все еще не располагает простыми и экономичными методами выделения чистой культуры хеликобактеров. Клиническая значимость *Helicobacter pylori* и высокая частота вызываемых им заболеваний обуславливают необходимость обеспечения возможности адекватного обнаружения этого патогена у больных с гастродуоденальными заболеваниями (гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки – ГДЗ). Однако имеющиеся методы работы с *H. pylori*, особенно методы их культивирования, сложны и трудоемки и предусматривают использование дефицитных и дорогостоящих реактивов, поэтому практически не доступны большинству микробиологических лабораторий.

Целью данной работы было освоение методов лабораторной диагностики хеликобактериоза у больных гастродуоденальными заболеваниями. На первом этапе была поставлена задача оптимизировать состав питательной среды для ускорения процедуры выделения и увеличения вероятности получения чистых культур *H. pylori*.

Материалы и методы. Клинические изоляты *H. pylori* выделяли из желудочного сока 60 больных с гастродуоденальными заболеваниями. Биоптаты больных были получены в Республиканском научном центре хирургии им. Вахидова МЗ РУз. В работе использовали коммерческий сердечно-мозговой агар, хеликобактерный кровяной агар (ХКА), эритрит агар. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры к средам добавляли селективные агенты (ванкомицин или ристомицин, налидиксовая кислота, полимиксин В, амфотерицин В, триметоприм, цефсулодин и др.) как по отдельности, так и в различных сочетаниях (удобна специаль-

ная селективная добавка для хеликобактеров, Campylobacter Selective Supplement FD090 Hi-Media). Инкубация посевов проводилась при температуре 37°C и влажности 98% в микроаэрофильных условиях в течение 3–7 сут.

Результаты. На среде с сердечно-мозговым агаром с добавкой 5% крови колонии *H. pylori* вырастали раньше (через 24 ч), но с большим разнообразием обсеменения. В наших исследованиях уровень контаминации биоптатов был более 60%. В большинстве случаев это были колонии (чаще всего стафилококки, синегнойная палочка, энтерококки, кишечная палочка и грибы), наблюдали сплошной рост контаминантов, затрудняющий выявление *H. pylori*. Учитывая процент снижения частоты выделения *H. pylori* при использовании известной селективной среды, мы считали возможным не вводить в среду кровь и взамен добавляли селективную добавку, ингибирующую рост контаминантов, и флуконазол. Для интенсификации роста хеликобактеров в селективную среду добавляли витаминную ростовую добавку и для выявления *H. pylori* – индикатор 2,3,5-трифенил тетразолиум хлорид.

Выводы. Результаты исследований по подбору оптимальных условий для выделения *H. pylori* показывают, что селективная среда на основе сердечно-мозгового агара (Brain Heart Infusion Agar M 211) с добавлением специальной селективной добавки с антибиотиками и витаминной ростовой добавкой, флуконазола, индикатора 2,3,5-трифенил тетразолиум хлорида наиболее пригодна для выделения и культивирования *H. pylori* из биоптатов слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки и желудочного сока. Это позволило выделить 4 штамма *H. pylori* от 60 обследованных больных с ГДЗ. Колонии всех штаммов грам(-), гемолитические, плоские, влажные, блестящие, прозрачные, сходные с каплями конденсата водяных паров. Таким образом, нами подобрана питательная среда, позволяющая повысить селективность среды для снижения степени контаминирующей сопутствующей флоры и увеличения частоты выделения штаммов *H. pylori*, что очень важно для диагностики гастродуоденального хеликобактериоза. Необходимо продолжение изучения чувствительности клинических штаммов *H. pylori* к различным антимикробным средствам, а также другим антимикробным факторам для повышения эффективности антимикробной терапии хеликобактериоза и проведения оперативной ее коррекции при появлении резистентных культур возбудителя.

Факторы риска развития инфекции в области хирургического вмешательства

Лайман Е.Ф., Шаркова В.А., Шевелев И.К.

ФБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», г. Владивосток;
Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае в городе Лесозаводске»,
Приморский край

Инфекция остается трудной, сложной и очень важной проблемой хирургии. Особое значение приобретает анализ причин, условий возникновения, особенностей профилак-

ки, течения гнойных заболеваний, инфицированных ран и их лечения с учетом научно-технического прогресса, развития многих разделов науки [Стручков В.И., 1991; Meakins J., 2005].

Среди наиболее важных причин, определяющих возникновение раневой инфекции, зарубежные авторы выделяют 3 группы факторов: предоперационные, интраоперационные и постоперационные [Pessaux P., 2003]. Отечественные исследователи выделяют 4 группы: факторы, обусловленные состоянием пациента; подготовкой и проведением операции, микроорганизмами, окружающей средой [Абаев Ю.К., 2007; Захарова Ю.А., 2007; Лоран О.Б., 2007; Карниз А.Ф., 2010].

В связи с влиянием на возникновение инфекций в области хирургического вмешательства (ИОХВ) ряда предрасполагающих, сопутствующих факторов и провоцирующих условий мы выяснили их наличие в группе из 437 пациентов хирургического стационара, которым проводились операции, затрагивающие практически все органы и ткани. Все признаки были условно разделены на 4 группы [Абаев Ю.К., 2007]. Самыми частыми факторами риска и условиями, предрасполагающими к развитию ИОХВ, явились факторы, обусловленные подготовкой и проведением операции (57,4 ± 2,4%). К числу таких факторов были отнесены: срочность проведения – 47,4 ± 2,4%; характер вмешательства (сочетанные операции) – 5,7 ± 1,1%; дренирование раны – 2,7 ± 0,8%; длительное пребывание в стационаре перед операцией – 0,7 ± 0,4%; длительность хирургического вмешательства и кровопотеря более 800–1000 мл и недостаточный гемостаз (кровотечение) по 0,5 ± 0,3%.

Факторы, обусловленные состоянием больного, также встречались со значительной частотой – 47,4 ± 2,4%. Среди них ведущее место занимали курение (23,1 ± 2,0%); колонизация микроорганизмами кожи больного (АМФК ≥10⁵) – 14,2 ± 1,7%; возраст старше 60 лет (8 ± 1,3%). Как фактор, влияющий на возникновение ИОХВ, микроорганизмы обнаруживались в операционной ране с частотой 33,6 ± 2,3%, а с критической плотностью (≥10⁵) – с частотой 31,8 ± 2,2%. Факторы риска, связанные с окружающей средой (неудовлетворительные пробы воздуха и смывов с поверхностей), были минимальны и составили 5,2 ± 1,0%.

Таким образом, по данным наших исследований, микробный фактор являлся преобладающим: колонизация микроорганизмами кожи больного, микробное обсеменение раны. Факторы риска, связанные с окружающей средой, оказались с наименьшими значениями.

Изучение пробиотиков для инноваций в инфектологию

Лахтин В.М., Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А.

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского», г. Москва

Обобщены собственные результаты (в скобках – перспективы для инфектологии): Метаболитные технологии: *карты метаболитов 27–200 кД и рI 4–8 (разделение кислых и ще-

лочных таксономически значимых систем; штаммотипирование в защищенной катионной области); *(суб)цитотоагглютинирующие активности: сцепленные с сорбцией и лектиновой сборкой (цитокиновые, типизирующие); *функциональный блотинговый анализ каскадных культур в комбинированных питательных средах (ПС) – молоке с переносом в казеино-дрожжевую среду (разработка штамм-поддерживающих ПС путем сравнения карт компонентов в идентичных условиях); мониторинг лектинов, ферментов и экзополимерных соединений (экспрессия в консорциумах); *анализ альфа-S-, бета/гамма- и каппа-казеиназ (повышение эффективности ПС, наработка эффекторов консорциумами); *штамм-зависимые системы протеиназ, деполимераз и/или пероксидазы- каталазы-подобных оксидоредуктаз (оценка цитолиза, окислительного стресса, факторов вирулентности, изменения и старения культуры при пассажах и хранении); *лектиновые системы «строительные» и сигнальные (стандартизация культур, анализ коммуникационных сетей); *оценка синергизма ГК-узнающих агентов и антибиотиков (подбор комбинаций для терапии); *системы природные и рекомбинатные, ориентированные на распознавание ГК с известной структурой (стандартизация штаммов); *имитация действия консорциумов (замена клеток на метаболиты распознавания; поддержка культур). Клеточно-метаболитные технологии: *для грамположительных бактерий (условно-патогенных и патогенных); *характеристика сенсорных бактериально-дрожжевых систем (выявление кофункционирующих систем); *конструирование сбалансированных метаболитно-клеточных консорциумов (симбиотических, мультивакцинных); *направленная сборка цитокино-клеточных градиентов обратимых функциональных с навигацией лектинами (оценка защиты и деградации клеток); *биопленкообразование ранжированное раннее и отсроченное (прогностико-диагностический анализ смешанных культур); *видзависимая перестройка антагонистических МБ (прогнозирование взаимовлияния пулов микробов, влияния антибиотиков); *лидерные штаммы и виды в МБ (оценка дестабилизирующих МБ штаммов); *синхронизация МБ для усиления действия анти-микробных средств (усиление действия на патогены); *меж-кишечные реакции ландшафтные и в суспензиях (оценка коммуникационных массивов, противопоставленных анти-микробным синергистическим агентам); *лектинотипирование дисбиотических МБ (ранняя диагностика пациента, разработка стратегий терапии).

Лектины пробиотиков: свойства и перспективы

Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Алешкин В.А.

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского», г. Москва

Нами идентифицированы лектины – распознающие гликоконъюгаты (ГК) белки – пробиотических штаммов лактобацилл *L. amylovorus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. plantarum* и бифидобактерий *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* – ингредиентов пробиотиков. Лектины

пробиотиков представлены системами (СЛП) белков 50–80 кД: сильнокислыми (рI 4–4,5; выраженные цитотоагглютинины и участники сборок), слабокислыми (рI 5–7) и катионными (рI 7–8,5; ассоциированы с экзополимерными соединениями). Мультиштаммовые пробиотики характеризуются вкладом СЛП штаммов. СЛП связывают ГК на основе полиакриламидного коа (www.lectinity.com). СЛП включают мажоры (определяющие вектор активностей) и миноры (сигнальные, новые метаболиты распознавания). СЛП штамма способны распознавать различные типы ГК, которые могут быть упорядочены по сродству к СЛП, в зависимости от окружения (присутствие кофункционирующих, в том числе каскадных СЛП). СЛП распознают гликоантигены, пептидогликаны, нейтральные и анионные аналоги маннанов, галактанов, фукана и муцинов. Результаты согласуются с действием на sensibilized гидролазами эритроциты. Сорбированные ЛП инициируют градиенты клеточно-цитокиновых сборок и сцепленные с распознаванием ГК биологические активности. В распознавании ГК и сборках участвуют ароматические аминокислоты и металлы (Li^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+}). Металлы (например, Ru^+) модифицируют спектры форм СЛП. СЛП имитируют антигрибковые и против грамположительных бактерий активности пробиотиков-клеток; синергичны между собой, с антибиотиками и факторами стресса; ослабляют межклеточные коммуникации патогенов; организуют синбиотические процессы; кофункционируют с ГК в процессе регуляции макрофагов; влияют на продукцию цитокинов лейкоцитами. СЛП – метаболомбиотики, участвуют в Quorum Sensing и Cross-Talking. Потенциал применения СЛП обусловлен перспективами фенотипирования и прогностической оценки штамма, конструирования мультипро/синбиотиков, использования как носителей и доставщиков ГК (метабиотиков, лекарств, антибиотиков, пребиотиков), синергистических агентов поддержки биотопов при профилактике и терапии с использованием антибиотиков и химиопрепаратов.

Особенности хронического гастрита при ассоциации *Helicobacter pylori* и вируса Эпштейна-Барр в детском возрасте

Левит Р.М.¹, Спивак Е.М.¹, Карпов Н.Л.², Кузьмина Г.В.², Деменчук М.Ю.², Саляхутдинова Н.В.², Барановская Т.Н.²

¹ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», г. Ярославль;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской области», г. Ярославль

Цель работы: установить особенности клинических, эндоскопических и морфологических проявлений хронического гастрита у детей при ко-инфицировании слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* и вирусом Эпштейна-Барр.

Пациенты и методы. Под нашим наблюдением находилось 190 детей в возрасте 8–16 лет с хроническим Нр-ассоциированным гастритом. В отношении всех пациентов проведено клиническое, лабораторное и эндоскопическое обследование. Анализ материала гастробиоптатов осуществ-

влялся в соответствии с визуально-аналоговой шкалой (Сиднейская система, Хьюстонская модификация). С помощью полимеразной цепной реакции в слизистой оболочке желудка (СОЖ) определяли персистенцию вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) и проводили типирование Нр. Генетический анализ штамма инфекта включал выявление основных факторов патогенности *CagA*, *VacA*, *IceA*, *BabA*.

Результаты. Персистенция ВЭБ в антральной области и в теле желудка обнаружена у 83 больных (43,7%). В 49 случаях (59%) генетическое типирование Нр позволило установить наличие высокопатогенных штаммов данного микроорганизма, частота которых практически вдвое превышает общепопуляционный показатель (около 30%). У пациентов, имеющих такое коинфицирование, не обнаружено каких-либо особенностей, касающихся клинической феноменологии хронического гастрита (частота и характер проявлений болевого, диспептического, интоксикационного, астеновегетативного синдромов). Одновременно сочетание ВЭБ и высокопатогенных штаммов Нр сопровождалось расширением зоны воспаления с формированием у половины детей картины пангастрита; у 79,6% из них после проведения морфологического исследования гастробиоптатов диагностирован выраженный, а в 20,4% – умеренный процесс. В 2/3 случаев в антральном отделе обнаруживались признаки неопределенной атрофии слизистой оболочки.

Заключение. Коинфицирование слизистой оболочки желудка высокопатогенными штаммами *Helicobacter pylori* и вирусом Эпштейна-Барр при хроническом Нр-ассоциированном гастрите у детей приводит к формированию выраженного распространенного воспаления.

Результаты лабораторного обследования для выявления ротавирусов и криптоспоридий у пациентов педиатрических стационаров

Лиханская Е.И., Феклисова Л.В., Яний В.В.

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского», г. Москва;

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», г. Москва

Цель. Изучение уровня экскреции ротавирусов и криптоспоридий при одновременном лабораторном исследовании проб кала, трехкратно взятых у детей и взрослых в педиатрических стационарах.

Материалы и методы. Проведено исследование 439 проб фекалий пациентов (219 детей) и взрослых (220 ухаживающих матерей и медицинского персонала) в 4 детских инфекционных и соматических отделениях. Использованы иммунохроматографические методы выявления ротавирусов и криптоспоридий.

Результаты. При трехкратном в течение года вирусологическом скрининге ротавирусы обнаружены у 27 из 219 пациентов (12,3%). Из образцов кала взрослых ротавирусы выявлены у одной матери (8,6%), 1 из 220 (0,45%).

Из тех же образцов криптоспоридии найдены у 19 (8,6%), в том числе у 14 детей (6,4%) и у взрослых лиц (матери).

При сравнении встречаемости ротавирусов и криптоспоридий у детей определена более частая экскреция вирусов у пациентов (12,3% против 6,4%). У взрослых лиц соотношение было обратным (0,45% против 2,3%), т.е. чаще находили криптоспоридии.

В целом у больных детей в стационарах ротавирусы и криптоспоридии обнаруживали чаще, чем у взрослых здоровых лиц этих учреждений (12,3% и 6,4% против 0,45% и 2,3%).

Имелись различия в возрастном составе больных детей. Положительные результаты на ротавирусы были практически у всех детей в возрасте до 3 лет, на криптоспоридиоз – преимущественно у детей старшей группы. Совсем отсутствовали криптоспоридии у новорожденных и пациентов первых месяцев жизни.

В сезонный пик заболеваемости ротавирусной инфекцией (февраль) встречаемость криптоспоридий не увеличилась.

Обнаружение криптоспоридий совпало с одновременной экскрецией ротавирусов в 11 из 19 случаев (57,9%), с заметным преимуществом у детей (10 из 14 – 71,4%).

Таким образом, при экскреции ротавирусов у пациентов педиатрических стационаров криптоспоридии обнаружены в 57,9% случаев, в основном у детей.

Оптимизация условий культивирования хемотрофов рода *Acidithiobacillus* для получения металлов в наноразмерном виде

Локтева А.В., Савушкин А.И.

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск

В настоящее время все больше появляется информации о возможном применении металлов в наноразмерном виде в биомедицине. Так, никельсодержащие сплавы успешно используются в протезировании и брекет-системах, редкоземельные металлы применяются в лазерных установках и рентгеновских аппаратах. Нитинол (материал из никеля и титана), обладающий памятью формы, и сейчас активно используется для создания медицинских приборов нового поколения. Соединения лантана считаются перспективными для использования в терапии мочекаменной болезни. Одним из способов получения металлов биомедицинского назначения в наноразмерном виде является их выщелачивание из природного сырья активными окислителями микробной этиологии, представленными хемотрофными мезофильными микроорганизмами. Для экстракции из руды металлов в наноразмерном виде на курсе микробиологии ПетрГУ получены чистые культуры хемотрофов рода *Acidithiobacillus*. Бактериологические исследования связаны с модификацией питательных сред и созданием оптимальных условий культивирования хемотрофов. Модифицирована среда Траутвейна для *Acidithiobacillus denitrificans*; среда Сильвермана и Люндгрена 9К для *Acidithiobacillus ferrooxidans*; среда Ваксмана для *Acidithiobacillus thiooxidans* и среда Старки для *Acidithiobacillus thioparus*. Благодаря

оптимизации условий культивирования получена серия штаммов *Acidithiobacillus* и оценена их биохимическая активность в процессах экстракции редкоземельных металлов из руды. С использованием растрового электронного микроскопа-литографа изучена топография микроорганизмов, элементный состав клеток и внеклеточных фракций. По результатам исследований выделенные культуры признаны перспективными для получения металлов в наноразмерном виде.

Характеристика штаммов энтерогеморрагических *E. coli* серотипов O111:H8 и O26:H11, выделенных от детей с острой кишечной инфекцией

Макарова М.А., Кафтырева Л.А.

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

Согласно современной классификации, штаммы диарейных *Escherichia coli* серологических групп O26 и O111 в зависимости от характеристики факторов вирулентности могут относиться к двум патогруппам: энтеропатогенным (ЕРЕС) и энтерогеморрагическим (ЕНЕС). Как правило, возбудители перечисленных серогрупп вызывают острые кишечные инфекции (ОКИ) у детей: энтериты (ЕРЕС) и гемоколиты (ЕНЕС). В Российской Федерации, в лабораториях, где не применяются молекулярно-биологические методы диагностики ОКИ, штаммы этих серогрупп идентифицируют как ЕРЕС в реакции агглютинации на стекле, а серологический вариант не определяют из-за отсутствия отечественных сывороток к Н-антигенам. Согласно МУК 4.2.2963-11 по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых *E. coli*, продуцирующими шига-токсины, у штаммов, относящихся к серогруппам O111, O55 и O26, необходимо проводить последующую детекцию шигаподобных токсинов или их генов. С целью оценки адекватности идентификации возбудителей ЕНЕС серогрупп O26 и O111 изучены факторы вирулентности у 69 штаммов *E. coli*, выделенных в период 2014–2016 гг. от детей с ОКИ: к O26 относились 52 штамма, к O111 – 17 штаммов. Для подтверждения серогруппы и определения серовара использовали молекулярное серотипирование (детекция генов *rfb* и *fliC*, кодирующих О- и Н-антигены соответственно). Далее проводили детекцию генов шигаподобных токсинов (*stx1* и *stx2*) и факторов адгезии (*bfr* и *eae*). Продукцию токсинов подтверждали иммунохроматографическим методом. К ЕНЕС относились 15 штаммов: O26:H11 (10 штаммов) и O111:H8 (5 штаммов). ЕНЕС штаммы имели гены, кодирующие шигаподобный токсин 1 (*stx1*) и фактор адгезии белок интимин (*eae*). Продукция токсина подтверждена в иммунохроматографическом тесте. 12 из 15 ЕНЕС штаммов (7 – O26:H11 и 5 – O111:H8) были устойчивы к цефалоспорином расширенного спектра (продукция β-лактамазы расширенного спектра СТХ-М-1) и хинолонам.

Наши исследования показали, что ЕНЕС серологических групп O26 и O111 вызывают ОКИ у детей в нашей стране, однако официально они регистрируются как ЕРЕС-инфекция. Детекцию шигаподобных токсинов (или генов, ответствен-

ных за их продукцию) необходимо широко внедрять в алгоритм идентификации возбудителей ОКИ. Ранняя этиологическая диагностика ЕНЕС-ассоциированных гемоколитов позволяет корректировать терапию, исключать или ограничивать применение определенных антибиотиков и снижать риск развития гемолитико-уремического синдрома.

Современная парадигма микробиологических исследований в Вооруженных Силах Российской Федерации

Малышев В.В., Сбойчаков В.Б., Змеева Т.А.

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», г. Санкт-Петербург

В структуре заболеваемости военнослужащих Вооруженных Сил Российской Федерации (ВС РФ) острые респираторные инфекции и острые кишечные инфекции (ОКИ) занимают ведущие ранговые места. Этиологический спектр возбудителей достаточно велик. В настоящее время в условиях базовых лабораторий ЦГСЭН МО РФ проводятся микробиологические, вирусологические исследования с учетом единых требований Санитарного законодательства Российской Федерации, с использованием современных методов диагностики: бактериологический, иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. В перспективе – полногеномное секвенирование; иммуно-ПЦР; масс-спектрометрия и другие.

Деятельность ВС РФ в стране и за рубежом влечет за собой избирательный характер применения имеющихся сил и средств медицинской службы при проведении микробиологической диагностики в полевых условиях. В последние годы для реализации диагностики внедряются устройства, комплекты, укладки, диагностикумы и тест-системы, изготовленные в России, часть из которых проходит тестирование в войсках в настоящее время.

В работе анализировались тесты для пробоподготовки и детекции отечественных производителей. При проведении полевых исследований нами использовались современные мембранные технологии для пробоподготовки, при этом за счет концентрирования кишечных патогенов стандартными и экспериментальными мембранами было уменьшено количество ложноотрицательных результатов при расшифровке структуры возбудителей ОКИ в пробах из объектов внешней среды. Использование новых подходов к пробоподготовке при оценке образцов из объектов внешней среды экспериментальными мембранами, мембранами с наведенным зарядом, мембранами из инновационных материалов, значительно повысило результативность, а также возможность применять экспресс-тесты, соответственно, такие методы, как иммунохроматографический анализ, реакция агглютинации латекса, иммунофлюоресценция.

Таким образом, современная парадигма микробиологических исследований в ВС РФ заключается в более широком применении экспрессных методов обнаружения маркеров возбудителей актуальных инфекций и факторов передачи патогенов.

Резистентность к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella* Newport

Матвеева З.Н., Егорова С.А., Кафтырева Л.А.

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», г. Санкт-Петербург

В популяции штаммов *Salmonella enterica* отмечены серовары, имеющие глобальное распространение. Для них характерна устойчивость к цефалоспорином расширенного спектра (ЦПС), а также множественная резистентность к 3 и более классам антимикробных препаратов (АМП). В 2000 г. в США впервые были выделены полирезистентные штаммы *Salmonella* Newport (multidrug resistant – MDR), устойчивые к нескольким классам АМП (ампициллину, амоксициллину/клавулановой кислоте, цефтриаксону, стрептомицину, сульфаниламидам, тетрациклину), устойчивость которых к ЦПС была обусловлена продукцией бета-лактамазы CMY-2 молекулярного класса C (AmpC-бета-лактамазы) – так называемые штаммы *S. Newport* MDR-AmpC. В настоящее время в США *S. Newport* является третьим по частоте выделения от людей сероваром (11,0% в 2014 г.), причем 3,0% штаммов этого серовара характеризуются фенотипом *S. Newport* MDR-AmpC. В странах Евросоюза штаммы *S. Newport* MDR-AmpC выделяют редко. Во Франции в 2003 г. возникла пищевая вспышка (14 человек), вызванная штаммом *S. Newport* MDR-AmpC, связанная с употреблением импортированной конины.

В Северо-Западном федеральном округе Российской Федерации серовар *S. Newport* выделяют от людей, животных и из продуктов животного происхождения очень редко (доля не превышает 0,4% в отдельные годы). В Санкт-Петербурге за период исследования с 2003 по 2016 гг. был выделен один штамм *S. Newport* (2003 г.), характеризующийся фенотипом *S. Newport* MDR-AmpC, продуцирующий бета-лактамазу CMY-2. Штамм был выделен из испражнений пациента 23 лет, госпитализированного с обострением хронического нефрита. Симптомы энтероколита появились у больного во время пребывания в стационаре, что позволило заподозрить случай внутрибольничного заражения. Эпидемиологическое расследование не выявило источник и пути передачи инфекции. При определении чувствительности штамма к бета-лактамам АМП установлено, что штамм устойчив к ампициллину, цефотаксиму, цефтазидиму, цефокситину и азтреонаму, но чувствителен к цефепиму и меропенему. Резистентность штамма к цефокситину, чувствительность к цефепиму, синергизм между цефалоспоринами и флуксациллином, отсутствие синергизма с клавулановой кислотой позволили предположить продукцию AmpC-бета-лактамазы. Молекулярно-генетическое исследование показало, что штамм продуцирует бета-лактамазу CMY-2; кодирующий ген *bla*CMY-2 находился на плазмиде (125 kb). Кроме того, штамм имел интегрон 1 класса с генной кассетой 1 kb, кодирующей резистентность к некоторым аминоклизидам.

Переключение морфотипов *Burkholderia pseudomallei* в организме экспериментальных животных и при хранении культур

Меримова Л.К., Король Е.В., Сенина Т.В., Меримова О.А.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», г. Волгоград

Возбудитель мелиоидоза (*B. pseudomallei*) отличается разнообразием морфотипов колоний, формирующимся в процессе их переключения в макроорганизме или в стрессовых условиях среды. Считают, что феномен переключения является одним из механизмов адаптации к неблагоприятным факторам, в т.ч. адаптации в макрофагах и персистенции в организме хозяев.

Исследовали переключение при хранении и в организме экспериментальных моделей 7 морфотипов вирулентного штамма *B. pseudomallei* 110, полученных ранее при пассаже микроорганизма и его сокультур с клетками *Tetrahymena pyriformis* в LB и стерильной речной воде. Изогенные культуры каждого морфотипа хранили в полужидком Nutrient agar при 20°C. Вирулентность морфотипов определяли на мышах BALB/c и золотистых хомячках. Культуры высевали на среду Эшдауна, инкубировали 3 сут при 32°C, колонии фотографировали и определяли морфотипы в соответствии с существующей схемой идентификации.

Изначально полученные морфотипы обладали снижением вирулентности для золотистых хомячков и вызывали их гибель при заражении дозой 1×10^2 м.к. в срок 26–34 сут. Культуры от павших животных, зараженных как исходным штаммом, так и любым из его морфотипов, показали принадлежность к варианту, обозначенному как I ChI. Гибель мышей BALB/c наблюдали только при заражении исходным штаммом *B. pseudomallei* 110, при этом от павших животных выделяли культуры двух разных морфотипов: I ChI типа – от животных, погибших в течение 3–5 дней после заражения, III ChI типа – в более отдаленные сроки.

Хранение морфотипов в течение 6 мес обнаружило переходные формы и появление вариантов со структурными признаками исходного морфотипа, идентифицированного как морфотип VI. Спустя 10 мес все морфотипы были представлены преимущественно колониями варианта VI. Одновременно с изменением морфологии наблюдалось частичное восстановление вирулентности культур для золотистых хомячков, от которых изолировали культуры морфотипа I ChI.

Таким образом, в организме экспериментальных животных переключение морфотипов *B. pseudomallei* 110 приводило к образованию преимущественно варианта I ChI, характерного для клинических изолятов микроорганизма; в отсутствие стрессового воздействия все культуры приобретали тенденцию к стабилизации в форме морфотипа VI.

Современные аспекты микробиологического мониторинга холеры: интеграция молекулярно-генетических методов в диагностический процесс и схему идентификации возбудителя

Миронова Л.В., Балахонов С.В., Хунхеева Ж.Ю., Пономарева А.С., Басов Е.А., Гладких А.С., Бочалгин Н.О.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск

Микробиологический мониторинг холеры как составная часть диагностической подсистемы надзора за инфекцией в РФ предусматривает исследование клинического материала от контингентов риска, анализ проб из объектов окружающей среды (ООС) на предмет контаминации холерным вибрионом, а также комплексную характеристику биологических свойств выделенных культур. Развитие молекулярных технологий определяет целесообразность их интеграции в диагностический процесс и расширенную идентификацию *V. cholerae* с оценкой эффективности и информативности применения тех или иных подходов на разных этапах исследования.

В рамках многолетнего мониторинга показана высокая эпидемиологическая эффективность ПЦР-скрининга видов и серогруппоспецифических детерминант *V. cholerae* в обогащенных пробах из ООС на этапе бактериологического анализа. При этом особую значимость данный подход приобретает в качестве сигнального при определении границ контаминации водного объекта холерным вибрионом как в период эпидемиологического благополучия (при выделении *V. cholerae* O1/O139), так и в период эпидемических осложнений.

На этапе идентификации, наряду с молекулярно-генетическими тестами оценки принадлежности в виду, серогруппе, биовару, доказана высокая диагностическая ценность определения таксономической принадлежности выделенных культур по профилю константных белков микробной клетки с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии. Более того, масс-спектрометрический анализ высокоэффективен и при углубленной характеристике культур в плане детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в реакции минисеквенирования. В частности, с использованием данного подхода показана возможность идентификации генетически измененных вариантов вибриона Эль Тор на основе детекции SNP в структуре гена субъединицы В холерного токсина.

Применение комплекса методов молекулярного типирования, выбор которых должен осуществляться с учетом цели исследования, позволяет установить закономерности развития эпидосложнений по холере, а также оценить структуру и динамику популяций холерного вибриона в объектах окружающей среды в период эпидемиологического благополучия.

Экспериментальное исследование воздействия стрессовых условий на генотип *Vibrio cholerae*

Миронова Л.В., Басов Е.А., Хунхеева Ж.Ю., Пономарева А.С., Балахонов С.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск

Генотипирование *V. cholerae* осуществляется с применением широкого круга методов, заключающихся в амплификации участков генома, рестрикционном анализе, секвенировании генов-мишеней или полногеномном секвенировании. При этом актуальны вопросы стабильности используемых для типирования маркеров, а также представления о закономерностях их изменчивости в стрессовых условиях пребывания холерного вибриона.

В эксперименте в условиях дефицита питательных веществ при разных температурах инкубации (низкой – 6°C и комнатной – 20–22°C) проведено изучение изменчивости генов патогенности, локусов варибельных тандемных повторов, пульс-электротипа и генов «домашнего хозяйства» *V. cholerae*.

В результате установлено изменение фенотипических свойств культур, выражающееся в формировании нетипичных колоний, часть из которых демонстрировала признаки перехода в «персистирующий» фенотип. Что касается генетических перестроек, то они затронули локусы варибельных тандемных повторов и привели к трансформации макрорестрикционного профиля ДНК исследуемых штаммов. Частота изменчивости VNTR-профиля при низкой температуре составила 4×10^{-2} , в условиях инкубации в микрокосмах при комнатной температуре – $7,2 \times 10^{-2}$. Наиболее подвержены генетическим модификациям оказались локусы VcB и VcA. Максимальная частота трансформации VNTR-профиля установлена для генетически измененного *V. cholerae* O1 El Tor (16×10^{-2}), превышающая данный показатель для токсигенного геноварианта из поверхностного водоема ($t = 2,96$; $p < 0,01$) и нетоксигенного *V. cholerae* O1 El Tor ($t = 2,38$; $p < 0,05$). Частота изменчивости PFGE-профиля исследованных штаммов выше ($t = 4,3$; $p < 0,01$) таковой VNTR-профиля и составляет 8×10^{-2} при низкой температуре и 26×10^{-2} – при комнатной. Наиболее подверженными модификациям генома оказались геноварианты вибриона Эль Тор, а среди них – клинический изолят (частота изменчивости – 44×10^{-2} ; $t = 2,5$; $p < 0,05$). Структура генов «домашнего хозяйства» была стабильной на всем протяжении эксперимента. Изменения не затронули и гены основных факторов патогенности холерного вибриона.

Установленную потенциальную возможность трансформации генотипа *V. cholerae* в условиях пребывания в окружающей среде необходимо учитывать при оценке результатов генотипирования.

Определение филогенетического положения *ctxA-tcpA⁺ Vibrio cholerae* O1 El Tor на основании полногеномного анализа

Миронова Л.В., Бочалгин Н.О., Феранчук С.И., Гладких А.С., Пономарева А.С., Балахонов С.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск

Анализ результатов мониторинга вибриофлоры водоемов Сибири и Дальнего Востока показал, что наряду с эпидемически неопасными *ctxAB-tcpA⁻ V. cholerae* O1, в редких случаях обнаруживаются вибрионы Эль Тор, содержащие ген *tcpA* при отсутствии генов *ctxAB* и обозначенные как потенциально эпидемически опасные. В частности, такие варианты *V. cholerae* O1 выделены в Алтайском крае в 2011 г. и Хабаровском крае в 2013, 2016 гг. Особенности генетической организации данной группы штаммов определяют необходимость их углубленного изучения для понимания происхождения и значимости в инфекционной патологии.

В работе проведено исследование полных геномов двух *ctxA-tcpA⁺ V. cholerae* O1, выделенных в Алтайском и Хабаровском краях. Секвенирование геномов проводилось на GS Junior по протоколу Roche. Для филогенетического анализа использовались 36 размещенных в GenBank последовательностей геномов предпандемичных и пандемичных штаммов *V. cholerae*. Выравнивание ридов на геном референсного *V. cholerae* O1 N16961 проводилось с помощью bowtie2. Реконструкция филогении проводилась по алгоритму RaXML.

В результате на дендрограмме все пандемичные штаммы выборки распределились на группы с учетом установленных ранее волн распространения холеры. Формирование ветвей предпандемичными *V. cholerae* согласуется с определенными Hu D. с соавт. (2016) этапами формирования патогенного клона пандемии. Изолированные в Алтайском и Хабаровском краях *ctxA-tcpA⁺ V. cholerae* O1 вошли в группу, объединяющую изоляты, отнесенные Hu D. с соавт. (2016) к третьему этапу становления патогенного клона *V. cholerae* El Tor. Данная группа включает штаммы *V. cholerae* с Американского побережья Мексиканского залива и подобные им по геномной организации изоляты из Китая. Стоит отметить, что по результатам сравнительного анализа геномов *V. cholerae* O1 из Хабаровска (2013 г.) демонстрирует сходство с выделенным от вибриононосителя в Китае штаммом. Эти данные согласуются с высказанным нами ранее предположением о том, что *ctxA-tcpA⁺ V. cholerae* могут быть промежуточным этапом при формировании патогенного клона вибриона Эль Тор, однако для окончательного суждения об их происхождении требуются дальнейшие исследования.

Питательная среда для культивирования и подсчета молочнокислых стрептококков

Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Шепелин А.П., Миронова Е.Н.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk

Международной молочной федерацией (IDF), требованиями ГОСТ ISO 7889-2015, ГОСТ ISO 27205-2013 для культивирования и селективного подсчета молочнокислых стрептококков в йогурте и других молочнокислых продуктах, содержащих *Streptococcus thermophilus*, рекомендован Агар М 17, производство которого в России отсутствует. Во ФБУН ГНЦ ПМБ оптимизирован состав, разработана технология и налажено производство питательной среды для культивирования и подсчета молочнокислых стрептококков, не уступающей по качеству Агару М 17 ведущих фирм-производителей.

Молочнокислые стрептококки требуют сложных питательных сред для оптимального роста. Необходимым условием для этих сред является высокая буферная емкость, что позволяет поддерживать pH среды в процессе культивирования на нейтральном уровне и приводит к подавлению роста лактокобацилл. Разработанная среда содержит в своем составе панкреатический гидролизат казеина, панкреатический гидролизат рыбной муки, дрожжевой экстракт, мясной пептон, аскорбиновую кислоту, сернистый магний, глицерофосфат натрия и агар.

Цель работы. Оценить разработанную питательную среду для культивирования и подсчета молочнокислых стрептококков при анализе различных молочнокислых продуктов, содержащих термофильные стрептококки.

Материалы и методы. Молочнокислые продукты, содержащие молочнокислый стрептококк: «Варенец термостатный» (ООО Останкинский молочный комбинат), «Йогурт» (Киржачский молочный завод), «Простокваша термостатная Брест-Литовск» (ОАО «Савушкин продукт»), ряженка «Домик в деревне» (ОАО «Вимм-Билль-Данн»). Высевали образцы продукции на разработанную среду двумя способами: поверхностным и глубинным. Культивировали посевами в аэробных условиях при 37°C в течение 48 ч. На разработанной среде получен микроскопически подтвержденный рост термофильного стрептококка во всех исследованных образцах: при глубинном посеве – в виде чечевицеобразных колоний, при поверхностном – в виде белесых круглых колоний. Культуры, выделенные из простокваши и ряженки, дополнительно проанализированы методом MALDI-TOF MS и с высокой вероятностью отнесены к *S. salivarius ssp. thermophilus*. Рост лактобацилл на разработанной среде отсутствовал, их присутствие определяли на MRS-агаре. Суммарное содержание молочнокислых микроорганизмов во всех исследованных образцах отвечало показателям, заявленным производителем, и находилось в диапазоне от $4,8 \times 10^8$ КОЕ/г в «Простокваше» до $8,0 \times 10^8$ КОЕ/г в «Варенце».

Вывод. Разработанная питательная среда для культивирования и подсчета молочнокислых стрептококков может быть рекомендована для выявления и подсчета *S. salivarius ssp. thermophilus* при анализе молочнокислых продуктов.

Результаты исследования продовольственного сырья и пищевых продуктов в отношении *Listeria monocytogenes*

Москвина Т.И., Иванова Н.П., Терентьева Н.В., Дубовая Н.Н., Перевалова Л.В., Петрова О.С.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области», г. Челябинск

Листерииоз как зооноз превратился в одну из наиболее значимых пищевых инфекций в мире, выделяющуюся среди других бактериальных инфекций особо тяжелым течением. Анализ эпидемиологической ситуации с листериозом в нашей стране и мире свидетельствует, что в основе эпидемиологического надзора за листериозом должен лежать регламент содержания *Listeria monocytogenes* в сырье и продуктах животного происхождения, птице, рыбе.

В РФ заболеваемость листериозом официально регистрируется с 1992 г.

Листерии выделяют из широкого спектра пищевых продуктов: мясных и куриных полуфабрикатов, копченостей и других изделий, яиц, молочных продуктов, овощей, замороженных морепродуктов (креветок), консервированного и свежего крабового мяса, копченой и маринованной рыбы. Замораживание, поверхностная дегидратация продуктов практически не влияют на выживаемость листерий, так же как вакуумная упаковка.

Листерии не относятся к числу микроорганизмов, культивирование которых представляет какие-либо трудности, для этих целей можно использовать широкий спектр питательных сред. Однако выделение возбудителя из продуктов питания оказалось малоэффективным без селективных компонентов. За последние годы произошел значительный прогресс в области методов обогащения исследуемого материала и конструировании питательных сред, что позволяет сделать процедуру выделения листерий доступной для широкого круга микробиологических лабораторий.

В бактериологической лаборатории проводятся исследования на обнаружение *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах и сырье с 2002 г. Используется методика в соответствии с ТР ТС 021/2011 по ГОСТ Р 51921-2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*».

До 2008 г. включительно для этих целей использовались среды отечественного производства: ПБЛ (питательный бульон для выделения и культивирования листерий) и ПАЛ (питательный агар для выделения листерий). С 2009 г. лаборатория использует селективный бульон UVM для обогащения листерий, хромогенный агар на *Listeria monocytogenes* по Оттавиани-Агости, обеспечивающие оптимальные условия для роста листерий. Включение в среды ингибиторов подавляет рост сопутствующих грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжей и грибов.

С 2010 г. в лаборатории для ускоренной идентификации *L. monocytogenes* применяется автоматический иммуноферментный анализатор miniVIDAS, с 2014 г. – используется микробиологический анализатор AutoScan-4 для подтверждения видовой принадлежности листерий.

Всего в бактериологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области» с 2008 г. по первое полугодие 2017 г. проведено 9055 исследований на выявление *L. monocytogenes*. Изолировано 123 культуры *L. monocytogenes*: из мяса и полуфабрикатов убойных видов животных выделена 71 культура, из мяса и полуфабрикатов птицы – 36 культур, из рыбы и гидробионтов – 3 культуры, из сырых овощей (преимущественно из картофеля) – 13 культур.

За период с 2002 по 2007 гг. исследовано 1592 пробы без выделения *L. monocytogenes*. В 2008 г. исследовано 740 проб, выделена 1 культура *L. monocytogenes*, высеваемость составила 0,14%. В 2009 г. исследовано 867 проб, выделено 38 листерий, высеваемость – 4,4%. В 2010 г. исследовано 1274 пробы, выделено 13 культур, высеваемость – 1,0%. В 2011 г. исследовано 734 пробы, выделено 2 культуры, высеваемость – 0,27%. В 2012–2013 гг. исследовано 666 и 620 проб соответственно, без выделения *L. monocytogenes*. В 2014 г. исследовано 822 пробы, выделено 8 культур, высеваемость – 0,97%. В 2015 г. исследовано 1172 пробы, выделено 26 культур, высеваемость – 2,2%. В 2016 г. исследовано 1110 проб, выделено 24 культуры, высеваемость – 2,16%. За первое полугодие 2017 г. исследовано 458 проб, выделено 11 культур, высеваемость – 2,4%. Не наблюдается сезонности при выделении культур.

Вывод. В г. Челябинске имеет место распространение *Listeria monocytogenes*, при этом заболеваемость листериозом не регистрируется. Все *Listeria monocytogenes* выделены из сырой продукции. Значительная доля – 87% листерий изолированы из мяса убойных видов животных и птицы.

Некоторые аспекты лабораторной диагностики иерсиний в плодовоовощной продукции в городе Челябинске

Москвина Т.И., Щербакова Т.А., Галкина Е.А., Иванова Н.П., Перевалова Л.В., Петрова О.С., Дубовая Н.Н.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области», г. Челябинск

В настоящее время заболеваемость иерсиниозами регистрируется во всех регионах страны, при этом наиболее распространенными возбудителями являются *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*. Мониторинг за циркуляцией иерсиний осуществляется для проведения адекватных санитарно-противоэпидемических мероприятий и исключения формирования эпидемиологических очагов в организованных коллективах.

В связи со значительной устойчивостью иерсиний к факторам внешнего воздействия, они постоянно попадают в окружающую среду, в том числе в овощехранилища, мясоперерабатывающие производства, объекты торговли продукцией растительного и животного происхождения, пищеблоками предприятий общественного питания, лечебно-профилактических, детских образовательных и оздоровительных учреждений.

Определенную роль в распространении иерсиний играют объекты внешней среды – инвентарь, тара, различные ем-

кости и контейнеры, обсемененность которых всегда имеет место.

Показатель заболеваемости иерсиниозами в г. Челябинске на 100 000 населения варьирует: в 2013 г. – 0,26, в 2014 г. – 0,6, в 2015 г. – 0,76, в 2016 г. – 0,25. Показатель заболеваемости среди детей выше, чем у взрослых и составляет: в 2014 г. – 1,43, в 2015 г. – 2,34, в 2016 г. – 0,45.

Исследования проводятся в соответствии с МУ 3.1.1.2438-09 «Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза».

За 2013–2016 гг. и первое полугодие 2017 г. лабораторией исследовано 3858 проб методом смывов с овощей и объектов внешней среды. Выделено 117 иерсиний: 95 культур – *Y. enterocolitica* б/в Ia (81,2%), 22 культуры – *Y. enterocolitica* б/в Ib (18,8%).

Из выделенных иерсиний 82 культуры (70%) обнаружены при исследовании плодоовощной продукции. Большая часть культур выделена с картофеля – 37,8%, капусты – 22%, моркови – 20,7%, свеклы – 14,6%, лука – 4,9%. С объектов внешней среды выделено 35 иерсиний. С овощей выделено в 2,3 раза больше иерсиний, чем с объектов внешней среды.

Высеваемость иерсиний с объектов внешней среды и пищевых продуктов составила в 2013 г. 0,2%, в 2014 г. – 0,37%, в 2015 г. – 3,3%, в 2016 г. – 6,1%, за первое полугодие 2017 г. – 5,78%.

Низкая высеваемость иерсиний отмечалась в 2013 и 2014 гг. В 2014 г. нами проанализированы протоколы отбора проб на иерсинии из пищеблоков детских дошкольных учреждений. Установлено, что из 225 проб объектов внешней среды 118 проб (52,4%) отобрано с чистых объектов (ножи, разделочные доски, кастрюли, столы) и только 24,4% проб отобрано с объектов хранения овощей (тара, стеллажи). В 2015 г. точки отбора были пересмотрены, и процент высеваемости иерсиний резко увеличился.

Основная часть иерсиний выделена в зимне-весенний период – 115 культур, и только 2 культуры выделено в осенний период.

Вывод. В г. Челябинске имеет место контаминация плодоовощной продукции иерсиниями (превалирует *Y. enterocolitica* б/в Ia), которые могут вызывать заболевания у людей, особенно у детей до 1-го года жизни.

Анализ результатов бактериологического контроля в лечебно-профилактических учреждениях г. Челябинска за 2013–2016 гг.

Москвина Т.И., Щербакова Т.А., Иванова Н.П., Первалова Л.В., Петрова О.С.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области», г. Челябинск

Бактериологическая лаборатория ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области» для лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) проводит исследования смывов, воздуха, стерильности, качества дезинфекции эндоскопов, контроля работы стерилизующей аппаратуры, эффективности обработки рук персонала.

В структуре бактериологических исследований за указанный период наибольший процент приходится на исследование смывов (2016 г. – 53%, 2015 г. – 56%, 2014 г. – 57%, 2013 г. – 53%), на втором месте – контроль работы стерилизующей аппаратуры (2016 г. – 14%, 2015 г. – 18%, 2014 г. – 17%, 2013 г. – 21%), затем исследование материала на стерильность (2016 г. – 21%, 2015 г. – 15%, 2014 г. – 16%, 2013 г. – 16%) и на последнем месте – исследование воздуха (2016 г. – 8%, 2015 г. – 11%, 2014 г. – 10%, 2013 г. – 10%). С 2016 г. в структуре исследований выделены исследования на эффективность обработки рук персонала и исследования по контролю качества дезинфекции эндоскопов. Процент положительных находок при исследовании эффективности обработки рук составил 7,8% (33 пробы), в одной пробе был выделен *S. aureus*. В остальных пробах были выделены *S. haemolyticus* – 45%, *S. saprophyticus* – 42,4%, *S. epidermidis* – 9%.

Проведено 960 исследований по контролю качества дезинфекции эндоскопов. Показатель общей микробной обсемененности (более 100 КОЕ/мл) исследуемых каналов эндоскопов составил 7,5% в 12 пробах с выделением в 11 пробах условно-патогенной микрофлоры и в одной – плесневых грибов.

Оценивая результаты бактериологического контроля смывов с объектов внешней среды ЛПУ, имеет место увеличение количества нестандартных проб по обнаружению *S. aureus* до 0,23% в 2016 г. против 0,12% в 2013 г., а также БГКП – 0,55% в 2016 г. против 0,12% в 2013 г. Количество исследований воздуха с 2013 г. по 2016 г. находится на одном уровне: 4382–4703 исследований в год. Имеет место увеличение нестандартных проб по показателям ОМЧ и *S. aureus* с 2014 г. по 2016 г. (*S. aureus* с 0,72% до 4,5%; ОМЧ с 4,57% до 8,88%). С каждым годом идет увеличение количества исследований материала на стерильность в ЛПУ г. Челябинска, так как контроль качества стерилизации материала является приоритетным исследованием. В 2016 г. нестандартные исследования составили 0,52% (2015 г. – 0,4%, 2014 г. – 0,097%, 2013 г. – 0,63%).

С 2013 г. по 2016 г. произошло снижение количества исследований эффективности работы стерилизующей и дезинфицирующей аппаратуры. Увеличился процент нестандартных проб при контроле эффективности работы паровых стерилизаторов с 0,77% в 2013 г. до 1,18% в 2016 г. При исследовании эффективности работы воздушных стерилизаторов процент нестандартных проб, напротив, уменьшился с 0,49% в 2013 г. до 0,15% в 2016 г. С 2014 г. по 2016 г. в два раза возросло количество нестандартных проб при исследовании эффективности работы дезинфекционных камер, что связано с увеличением числа проведенных исследований.

Общий процент проб, не соответствующих санитарно-противоэпидемическим требованиям, уменьшался с 2013 г. к 2015 г. (2013 г. – 1,3%, 2014 г. – 1,02%, 2015 г. – 0,96 %) и резко увеличился в 2016 г. по сравнению с предыдущими годами (составил 2,4%). Микробиологическая обсемененность внешней среды ЛПУ является одним из факторов, способствующих возникновению ИСМП.

В 2016 г. в медицинских организациях г. Челябинска отмечен рост числа инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) на 7,9%, зарегистрировано 1477

случаев (2015 г. – 1360 случаев, 2014 г. – 1176 случаев, 2013 г. – 1048 случаев).

По нозологической структуре из числа зарегистрированных ИСМП послеоперационные осложнения составили 31,9% (2015 г. – 29,12%, 2014 г. – 28,66%, 2013 г. – 29,9%), ГСИ новорожденных – 1,7% (2015 г. – 2,3%, 2014 г. – 4,08%, 2013 г. – 3,2%), ГСИ родильниц – 1,4% (2015 г. – 1,98%, 2014 г. – 1,7%, 2013 г. – 1,9%), пневмонии – 54,8% (2015 г. – 54,48%, 2014 г. – 52,04%, 2013 г. – 52%), постинъекционные осложнения – 1,9% (2015 г. – 2,28%, 2014 г. – 2,38%, 2013 г. – 2,5%), инфекции мочевыводящих путей – 5% (2015 г. – 5,29%, 2014 г. – 5,36%, 2013 г. – 5,2%), ОКИ – 0,6% (2015 г. – 1,76%, 2014 г. – 2,64%, 2013 г. – 2,2%), прочие инфекции – 2,6% (2015 г. – 2,6%, 2014 г. – 3,1%, 2013 г. – 3,0%).

В 2016 г. в г. Челябинске зарегистрировано 358 случаев послеоперационных инфекций, показатель 2,8 на 1000 операций (в 2015 г. – 295 случаев, показатель 2,4 на 1000 операций, в 2014 г. – 246 случаев, показатель 2,04 на 1000 операций; в 2013 г. – 313, показатель 2,6 на 1000 операций).

Вывод: достаточно высокий уровень инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, регистрируется на фоне нестабильных, но достаточно значимых микробиологических показателей объектов внешней среды в лечебно-профилактических организациях. Микробиологическая обсемененность внешней среды лечебно-профилактических организаций является одним из факторов, способствующих возникновению ИСМП.

Опыт определения холерных вибрионов O1-серогруппы при сезонном мониторинге поверхностных водоемов в Забайкалье

Мошкин А.Б., Мошкина А.А.

ФКУЗ «Читинская ПЧС» Роспотребнадзора, г. Чита

Согласно п. 4.8 санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры», в Российской Федерации проводится мониторинг поверхностных водоемов на наличие холерных вибрионов. Читинская противочумная станция проводит ежегодный сезонный мониторинг приграничных поверхностных водоемов в пределах Забайкальского края и Республики Бурятия (территории IIIБ), а также в г. Чите (р. Чита, оз. Кенон) и в Борзинском районе (оз. Харанор, р. Борзя). Также проводится круглогодичный мониторинг воды из бачков поезда Пекин-Москва.

Качественный и своевременный мониторинг поверхностных водоемов в Забайкалье актуален в связи с пограничным положением и наличием природных очагов нетоксигенного холерного вибриона O1 серогруппы. Период ежегодного выделения холерных вибрионов в Забайкальском крае с 1973 г. не прекращался.

Согласно п. 5.2.2 методических указаний МУК 4.2.2218–07 «Лабораторная диагностика холеры» при исследовании проб воды поверхностных водоемов на I–II этапах предлагается применять ускоренные методы: РНГА, ПЦР. В настоящее время лабораториям станции доступен метод ПЦР, который успешно применяется при выявлении вибриофлоры в различном материале.

ПЦР проводится в реальном времени на аппарате DT-lite (НПО «ДНК-технология») тест-системами «Ампли Сенс-Vibrio cholerae-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис»). Исследованию подлежат утренние пленки с I пептонной воды. С одной точки берется одна сборная проба по 50 мкл с бутылки/банки.

Установлено, если подъем кривой флуоресценции для гена *wbe* начинается на первых циклах («молчащие циклы» сейчас и далее не учитываются), то в дальнейшем холерный вибрион O1 серогруппы выделяется классическим бактериологическим методом всегда. При подъеме кривой флуоресценции на 20 циклах и далее идет выделение «агглютинирующего НАГа».

Таким образом, уже на следующий день после забора пробы видно наличие O1 холерных вибрионов, наличие генов холерного токсина, пилей адгезии, что позволяет:

- своевременно проводить противоэпидемические мероприятия;
- с точностью до дня определять период выявления холерного вибриона в поверхностном водоеме в данной точке;
- экономить питательные среды и сыворотки;
- высвободить кадровые ресурсы, необходимые при ежегодном сезонном мониторинге природного очага чумы.

Структура заболеваемости острыми кишечными инфекциями бактериальной этиологии среди детей, госпитализированных в инфекционный стационар г. Нижнего Новгорода

Назарова Л.В., Козлова М.П., Животовский М.В., Петелина В.С., Зубаров П.Г.

ГБУЗ НО «Инфекционная больница №23», г. Нижний Новгород

Острые кишечные инфекции (ОКИ) во всех без исключения странах остаются одной из серьезных проблем в здравоохранении. Несмотря на наибольшую этиологическую значимость вирусных возбудителей ОКИ, бактериальные кишечные инфекции не теряют своей актуальности и требуют своевременного и правильного диагностирования для назначения адекватной антибактериальной терапии и проведения противоэпидемических мероприятий. Инфекционная больница №23 оказывает медицинскую помощь детям и взрослым столицы ПФО. За период 2011–2016 гг. в стационаре пролечено 10 741 детей с диагнозом ОКИ. Лабораторная диагностика осуществлялась как прямыми методами – выявление чистой бактериальной культуры, обнаружение антигена возбудителей методом ИФА, обнаружение ДНК/РНК методом ПЦР (применение тест-системы «АмплиСенсОКИскрин-Fl» с декабря 2014 г.), так и косвенными – исследование сывороток крови методом РПГА (широко применялось до 2015 г.). Исследованиям методом ПЦР подвергались только фекалии пациентов с клиникой бактериальной ОКИ. В 4,8% случаев ОКИ были вызваны патогенными бактериями *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* и *Campylobacter spp.* (в 2011 г. – 4,35%, 2012 г. – 2,73%, 2013 г. – 4,95%, 2014 г. – 3,61%, 2015 г. – 5,85%, 2016 г. – 6,44%). Возбудитель сальмонеллеза был ведущим этиологическим агентом до 2015 г. (3,43% – 2011 г.,

2,73% – 2012 г., 2,99% – 2013 г., 2,94% – 2015 г., 2,71% – 2016 г.). Шигеллезы составили 0,86%, 0,88%, 2,08%, 0,46%, 0,14%, 0,19% соответственно. До 2015 г. более 90% диагнозов бактериальной дизентерии выставляли на основании клинической картины заболевания и наличия диагностически значимого титра антител. Ретроспективный анализ положительных серологических тестов показал, что исследование сывороток проводилось однократно. Повторные анализы в формате «парных сывороток» не проводились по причине выписки пациента, что сводит на нет диагностическую значимость теста. В 2015 и 2016 гг. лабораторное подтверждение шигеллеза составило 0,14 и 0,19%, несмотря на внедрение метода ПЦР. Снижение доли шигеллезов в структуре бактериальных ОКИ не противоречит данным эпидемиологического атласа по ПФО. Использование ПЦР позволило диагностировать кампилобактериозы у детей, их доля в 2016 г. превысила сальмонеллезы и составила 3,53% (сальмонеллез – 2,71%).

Изучение возможности применения металлоорганических каркасных соединений на основе терефталевой кислоты в качестве бактерицидных агентов для очистки воды

Найденко Е.В.¹, Кузнецов О.Ю.²

¹ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет», г. Иваново;

²ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», г. Иваново

Вода является основной составляющей не только жизни человека, но и разнообразных технологических процессов во всех отраслях промышленности. Обязательным условием использования воды является ее высокое качество и отсутствие вредных примесей. В настоящее время для очистки воды применяют наружные антисептические и дезинфицирующие средства, используются многие соединения, в том числе соединения на основе металлов. Одним из наиболее перспективных претендентов для создания нового класса бактерицидных агентов являются недорогие металлоорганические каркасные соединения (МОКС), построенные из металлических узлов и органических линкеров. Биологическая активность МОКС зависит от их физико-химических свойств.

В настоящей работе изучены возможности применения алюмо-, цинк- и титансодержащих металлоорганических каркасных соединений (Ti-, Al- и Zn-МОКС), синтезированных на основе терефталевой кислоты в качестве бактерицидных агентов для очистки воды. Исследование их бактерицидных свойств проводили на плотных и жидких питательных средах по общепринятой методике с использованием в качестве тест-микробов *S. aureus*, *E. coli*, грибов рода *Candida*. Определение острой токсичности водной вытяжки, содержащей частицы МОКС, на дафний (*Daphnia magna* Straus) устанавливалось по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Все три каркасные структуры не проявляли острого токсического действия. Полученные результаты коррелируют с литературными дан-

ными по токсичности отдельно взятого металла, входящего в состав каркасной структуры. Наиболее безвредным из исследуемых каркасных соединений оказался Ti-МОКС. Таким образом, последний может быть отнесен к классу практически нетоксичных веществ, т.к. исследуемое вещество не проявляет токсического действия до концентрации 100% и может быть использовано в качестве бактерицидных агентов для очистки воды.

Исследование микробиологических показателей безопасности пищевой продукции, реализуемой на потребительском рынке г. Перми

Новикова В.В.¹, Воронина Э.В.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия», г. Пермь;

²Пермский институт (филиал) ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В.Плеханова», г. Пермь

Организация продовольственной безопасности и формирование эффективного агропромышленного комплекса являются основой стабильности страны. Приоритетным направлением «Государственной программы развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия на 2013–2020 годы» является повышение конкурентоспособности российской продукции на внутреннем и внешнем рынках.

Доступность высококачественных товаров и услуг выступает гарантом повышения уровня жизни российских граждан – одного из стратегических национальных приоритетов. В условиях импортозамещения главным показателем эффективности пищевой промышленности является не только количество производимой продукции, но и ее безопасность.

Целью данной работы является обобщение и сопоставление результатов исследований микробиологических показателей безопасности пищевых продуктов, реализуемых на потребительском рынке Пермского края, а также выявление тенденции их изменения за 2015–2016 гг.

Исследование микробиологических показателей безопасности проводилось в лаборатории микробиологических испытаний ФГБОУ ВО ПГФА по следующим группам товаров: хлебобулочные, кондитерские, плодоовощные, безалкогольные напитки, пищевые концентраты и полуфабрикаты.

В 2015 г. проведено исследование 223 проб пищевых продуктов. Установлено, что требованиям Технического регламента Таможенного Союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» по микробиологическим показателям не соответствуют 42 образца (19%). Нарушения преобладали в группе «пищевые концентраты и полуфабрикаты», при этом несоответствие выявлено по ряду показателей, таких как количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, количество дрожжей и плесеней, а также наличие бактерий группы кишечной палочки. В 2016 г. выявлено 18% нестандартной продукции. Нарушения преобладали в той же группе.

Сравнительный анализ результатов исследования микробиологической безопасности пищевой продукции по основ-

ным группам товаров в 2015 и в 2016 гг. позволяет сделать вывод об улучшении общей ситуации. Вместе с тем, несмотря на снижение удельного объема недоброкачественной продукции на рынке, в некоторых группах товаров объем нарушений, касающихся микробиологических показателей качества, не изменился.

Проведенные исследования могут внести существенный вклад в деятельность контрольно-надзорных органов, проводящих исследования потребительских товаров в г. Перми, и позволят повысить эффективность их работы.

Подбор питательной среды для эффективной конверсии *H. capsulatum* в дрожжевую фазу

Новицкая И.В., Жога Л.К.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», г. Волгоград

Гистоплазмоз – особо опасная инфекция, вызываемая диморфным микромицетом *H. capsulatum*. Выделение возбудителя в тканевой фазе роста в дифференциальной диагностике гистоплазмоза имеет принципиальное значение. Выделение на чашке колоний дрожжеподобных клеток *H. capsulatum* служит неоспоримым лабораторным подтверждением данного микоза.

Цель работы сводилась к подбору условий *in vitro* для получения *H. capsulatum* в дрожжевой фазе роста (ДФ). В лабораторной микологии известна питательная среда Фрэнсиса, основанная на использовании мясного бульона с добавлением пептона (1%), D-глюкозы (1%), серосодержащих (цистина или цистеина) аминокислот (0,1%), а также дефибринированной крови животных (8%). Однако в последние годы, по нашим наблюдениям, ростовые свойства питательных сред на основе мясных экстрактов теряют свои качественные характеристики, что может быть связано с широким использованием в животноводстве антибиотиков, консервантов и других химических реагентов.

В наших исследованиях при выделении дрожжевых клеток *H. capsulatum* на традиционной среде Фрэнсиса мы столкнулись с рядом трудностей, в связи с чем нами были апробированы среды на основе перевара Хоттингера и FT-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). FT-агар, как и перевар Хоттингера, не позволяли получить на чашках роста дрожжеподобных колоний *H. capsulatum*, но эти же питательные среды, обогащенные *ex tempore* теми же, что и основа Фрэнсиса, ингредиентами, демонстрировали необходимые ростовые характеристики. При этом при одной и той же посевной дозе (10^3 м.к.) при росте в одинаковых условиях (37°C, 72 ч, питательные добавки) концентрация дрожжеподобных клеток *H. capsulatum* на среде, приготовленной на основе FT-агара, в состав которого входят гидролизат рыбной муки, дрожжевой экстракт, цистеин, сульфит натрия, сернистый магний, а также стимулятор роста гемофильных микроорганизмов, превышала таковую на среде Хоттингера и мясном бульоне Фрэнсиса в 7–20 раз соответственно.

Таким образом, с целью совершенствования лабораторной диагностики гистоплазмоза и верификации диагноза

нам кажется наиболее целесообразным использовать сухой питательный FT-агар с добавлением дефибринированной крови крупного рогатого скота (8%) и D-глюкозы (1%), который показал наиболее высокую эффективность при выделении колоний *H. capsulatum* в дрожжевой фазе роста.

Некоторые механизмы антибиотикорезистентности бактерий

Обухова Е.С.

ФБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск

Устойчивость к антибиотикам представляет собой растущую международную проблему для общественного здравоохранения и настоятельно требует пристального внимания.

Выделяют пять основных типов механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам: модификация мишени, инактивация молекулы антибиотика, выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс-эффект), нарушение проницаемости внешних структур бактериальной клетки, создание метаболического шунта.

Данные механизмы являются генетически детерминированными и чаще всего реализуются посредством экспрессии внехромосомных факторов наследственности бактерий – плазмид, интегронов и трансдуцирующих бактериофагов.

Уникальным механизмом антибиотикорезистентности бактерий является формирование биопленок. Бактериальная биопленка – это надклеточная система, состоящая из бактериального сообщества и ассоциированного с бактериями внеклеточного полимерного матрикса. В составе биопленки микробы обладают повышенной устойчивостью к эффекторам иммунной системы, антибиотикам и дезинфектантам. Биопленки способны проявлять множественную лекарственную устойчивость к нескольким препаратам антибиотиков.

Изучение механизмов антибиотикорезистентности бактерий является важным направлением развития микробиологии.

Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых инфекций на юге лесной зоны (на примере Калужской области)

Овсянникова Л.В., Корзиков В.А., Васильева О.Л., Винникова О.Н.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области», г. Калуга

Калужская область расположена в центре Восточно-Европейской равнины, и ее территория составляет 29,9 тыс. км². Согласно физико-географическому районированию, территория Калужской области лежит в пределах трех провинций: Смоленско-Московской, Днепровско-Деснинской и Среднерусской, что определяет разнообразие ее ландшафтов и животного мира, сочетающих черты лесной и лесостепной зон. Данные ландшафтные особенности региона благоприятствуют существованию долговременных природных оча-

гов таких инфекционных заболеваний, как туляремия, бешенство, лептоспироз, ГЛПС, иксодовые клещевые боррелиозы и др.

Видовой состав мелких млекопитающих (ММ) – потенциальных носителей и переносчиков природно-очаговых инфекционных заболеваний включает 29 видов, среди которых 8 видов землеройкообразных (*Soricomorpha*), 4 вида соневых (*Myoxidae*), 8 видов полевочных (*Arvicolinae*), 7 видов мышинных (*Muridae*), 1 вид мышовковых (*Sicistidae*) и 1 представитель отряда хищники (*Carnivora*). В настоящее время наибольшее эпизоотическое значение имеют следующие виды: рыжая полевка, полевая мышь, полевки *p. Microtus*, малая лесная и желтогорлая мыши, обыкновенная и малая бурозубки, серая крыса и домовая мышь.

Иксодовые клещи представлены одним видом рода *Dermacentor* и 5 видами (достоверное обитание 2 видов требует уточнения) рода *Ixodes*. Наибольшее эпизоотическое и эпидемическое значение имеют пастбищные виды: лесной (*Ixodes ricinus*) и луговой (*Dermacentor reticulatus*) клещи. Также определенную роль в циркуляции зоонозов играют представители таксонов *Gamasina* и *Siphonaptera*. Кровососущие двукрылые представлены 17 видами комарами (*Culicidae*), а также слепнями (*Tabanidae*) и другими таксонами.

В 2016 г. за 2 отчетных полугодия (1.11.2015–31.10.2016) в процессе поиска эпизоотий туляремии серологическим и биопробным методом было исследовано 459 экз. иксодовых клещей и 718 экз. ММ, среди которых в 37 пулах (экз.) ММ обнаружен положительный результат. На циркуляцию хантавирусов серологическим методом было исследовано 607 экз. ММ – положительный у 30 экз., на лептоспиры (ПЦР) 723 экз. ММ – положительный у 43 экз., на вирус лихорадки Западного Нила (ПЦР) 44 экз. ММ и 65 экз. комаров – маркеров возбудителя не обнаружено.

Определение патогрупп *Escherichia coli* в рамках исследования «на дисбиоз»

Оришак Е.А.¹, Косякова К.Г.^{1,2}, Нилова Л.Ю.¹, Торопова Е.В.¹, Немьтко Ю.А.¹, Оганесян Э.Г.¹, Каменева О.А.², Мельникова Г.С.²

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова», г. Санкт-Петербург;

²ГБУЗ «Детская городская больница» №22, г. Санкт-Петербург

В рамках исследования «на дисбиоз» требуется исключение основных бактериальных кишечных патогенов, из которых наиболее массово выявляемыми являются диареогенные эшерихии. Сложности серотипирования эшерихий усугубляются неочевидностью этиологической значимости находок.

Цель. Выявить распространенность факторов вирулентности среди типированных штаммов *E. coli*, выделенных от детей в ходе исследования «на дисбиоз».

Материалы и методы. Исследовано 70 штаммов *E. coli* с типичными свойствами, выделенных от детей 2–6 лет. Серотипирование выполняли с помощью агглютинирующих эшерихиозных сывороток (Biomed, Russia). Бактериальную ДНК выделяли из суточной культуры *E. coli* с использовани-

ем комплекта реагентов «Рибо-преп» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Выявляли специфические геномные последовательности ETEC, EPEC, EHEC, EAgEC и EIEC в ПЦР в режиме реального времени с использованием комплекта реагентов «Амплиценс-Эшерихиозы-fl» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) и анализатора CFX 96 (BioRad, США).

Результаты. Для оценки распространенности факторов вирулентности тестировали 70 штаммов *E. coli* с типичными свойствами в ПЦР. Отобраны 10 изолятов (14,3%), обладавших генами, кодирующими факторы вирулентности. Они были отнесены к следующим патогруппам: EPEC (5 штаммов), EAgEC (4 штамма), EHEC (1 штамм). Из означенных 10 штаммов лишь 3 поддались серотипированию.

Для оценки выявляемости значимых серотипов эшерихий в ходе исследования «на дисбиоз» провели серотипирование 70 штаммов *E. coli* с типичными свойствами. При серотипировании выявлены 5 штаммов, относящихся к EPEC и EAgEC, в отношении которых, однако, при проведении ПЦР не подтвердилось наличие генов, кодирующих факторы вирулентности.

Таким образом, в арсенале диагностических лабораторных процедур должен присутствовать ПЦР-скрининг эшерихиозов, и при наличии клинических проявлений предварять исследование «на дисбиоз» или завершать его при необходимости исключения эшерихиозов и корректной трактовки полученных результатов серотипирования эшерихий.

Микробный спектр возбудителей, выделенных из крови пациентов многопрофильного стационара

Орлова Е.С., Суборова Т.Н., Свистунов С.А., Мельникова Н.Н., Гуляев Т.Т., Конев С.Д.

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», г. Санкт-Петербург

Цель. Изучить спектр и чувствительность к антимикробным препаратам (АМП) возбудителей инфекции кровотока, выделенных в 2015–2017 гг. от пациентов многопрофильного стационара.

Материалы и методы. Исследовано 2970 образцов крови пациентов 10 хирургических и 10 терапевтических отделений многопрофильного стационара, получена 301 гемокультура. Идентификацию бактерий и определение чувствительности к АМП проводили с помощью бактериологического анализатора Vitek-2 (bioMérieux, Франция). Анализ данных проводили на основании отечественных критериев интерпретации (Клинические рекомендации, 2015).

Результаты. В спектре возбудителей, выделенных из крови пациентов, лидировали коагулазонегативные стафилококки (29,6%), *K. pneumoniae* (19,6%), *E. faecalis* (9,6%), *A. baumannii* (7,0%), *S. aureus* (7,0%) и *P. aeruginosa* (3,6%). Среди штаммов *K. pneumoniae* преобладали культуры, устойчивые к цефотаксиму, ципрофлоксацину, гентамицину, цефепиму, цефтазидиму, азтреонаму, нетилмицину, триметоприму/сульфометоксазолу. Устойчивыми к карбапенемам были от 30,8 до 47,5% изолятов, амикацину – 45,9%. Штам-

мы *A. baumannii* в 100% случаев были резистентны к цефтазидиму, ципрофлоксацину, от 60 до 90% – к амикацину, имипенему, меропенему, цефепиму, триметоприму/сульфометоксазолу, гентамицину, нетилмицину. Устойчивость штаммов *P. aeruginosa* к гентамицину составила 100%, цефепиму – 88,9%, цефтазидиму – 81,8%, ципрофлоксацину – 77,8%, азтреонаму – 50%, нетилмицину – 33,3%, амикацину – 12,5%. Устойчивыми к карбапенемам были 83,3–90% изолятов. Доля MRSA составила 31,6%. Среди штаммов *E. faecalis* ванкомицинрезистентные изоляты не обнаружены, устойчивыми к триметоприму/сульфометоксазолу были 88,9%, гентамицину – 40,0%, тигециклину – 16,7%. Выявлены различия показателей у гемокультур пациентов разных отделений. Так, в терапевтических отделениях 12,8% выделенных изолятов составил *S. aureus*, в том числе MRSA – 16,7%. В отделениях интенсивной терапии хирургических отделений 21,7% изолятов – *K. pneumoniae*, из них резистентных к имипенему – 44,8% штаммов.

Выводы. Вариабельность устойчивости микроорганизмов к АМП указывает на необходимость разработки стартовых протоколов применения антибиотиков в стационаре на основе данных локального микробиологического мониторинга.

Антибиотикорезистентность штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в психиатрической больнице Санкт-Петербурга в 2014 г.

Пилипенко С.Б.¹, Мамонова Е.А.¹, Голубева Ю.В.¹, Козлова Н.С.^{2,3}, Метляева А.В.⁴

¹СПБ ГКУЗ «Городская психиатрическая больница №3 им. И.И. Скворцова-Степанова», г. Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», г. Санкт-Петербург;

³ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр», г. Санкт-Петербург;

⁴ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», г. Санкт-Петербург

Цель исследования – оценка антибиотикорезистентности клебсиелл, выделенных в психиатрической больнице Санкт-Петербурга.

Материалы и методы. Была определена чувствительность к 9 антимикробным препаратам (АМП) 194 культур *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из различного материала пациентов с гнойно-септическими инфекциями в психиатрической больнице Санкт-Петербурга в 2014 г. Определение чувствительности к АМП проводили согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04 от 2004 г. Более половины штаммов были выделены из мокроты (60,8%), четверть – из мочи (26,8%), значительно меньшей была доля изолятов из ран (5,2%), зева (4,6%), носа (2,1%) и уха (0,5%).

Результаты. Среди клебсиелл преобладали антибиотикорезистентные культуры, удельный вес которых составил 87,1%. Чаще встречались штаммы, устойчивые к ингибитор-защищенным пенициллинам – амоксициллину/клавуланату (87,1%) и тикарциллину/клавуланату (86,1%). Очень высо-

ким (77,3%) оказался удельный вес культур, резистентных к цефалоспорином III (цефотаксиму и цефтазидиму) и IV (цефепиму) поколения. Около половины изученных штаммов проявляли устойчивость к фторхинолонам (51,0% – к ципрофлоксацину и 43,8% – к левофлоксацину). Был выявлен высокий удельный вес культур, устойчивых к карбапенемам, к меропенему оказались резистентны 34,5% выделенных изолятов. Наибольшую активность в отношении клебсиелл проявлял амикацин (17,5% устойчивых штаммов). Более половины выделенных культур (59,3%) составили полирезистентные штаммы. Всего у клебсиелл было выявлено 12 спектров антибиотикорезистентности, при этом чаще всего (24,7%) встречались изоляты с одновременной устойчивостью к восьми АМП (ингибиторзащищенным пенициллинам, цефалоспорином, фторхинолонам и меропенему). Штаммы, резистентные ко всем изученным АМП, составили 10,3%.

Выводы. Среди *K. pneumoniae*, выделенных в психиатрической больнице Санкт-Петербурга в 2014 г., преобладали антибиотикорезистентные культуры с высоким удельным весом полирезистентных штаммов. Наибольшую активность среди изученных АМП в отношении клебсиелл проявлял амикацин, однако к нему были резистентны 17,5% штаммов. Распространение в стационаре штаммов клебсиелл, устойчивых к карбапенемам (34,5%), является опасным прогностическим признаком, свидетельствующим о значительном уменьшении эффективности препаратов этой группы в отношении заболеваний, вызываемых клебсиеллами.

Антибиотикорезистентность штаммов *Escherichia coli*, выделенных в психиатрической больнице Санкт-Петербурга в 2014 г.

Пилипенко С.Б.¹, Мамонова Е.А.¹, Голубева Ю.В.¹, Козлова Н.С.^{2,3}, Метляева А.В.⁴, Гладин Д.П.⁴

¹СПБ ГКУЗ «Городская психиатрическая больница №3 им. И.И. Скворцова-Степанова», г. Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», г. Санкт-Петербург;

³ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр», г. Санкт-Петербург;

⁴ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», г. Санкт-Петербург

Цель исследования – оценка антибиотикорезистентности эшерихий, выделенных в психиатрической больнице Санкт-Петербурга.

Материалы и методы. Была определена чувствительность к 10 антимикробным препаратам (АМП) 88 культур *Escherichia coli*, выделенных из различного материала пациентов с гнойно-септическими инфекциями в психиатрической больнице Санкт-Петербурга в 2014 г. Определение чувствительности к АМП проводили согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04 от 2004 г. Более половины штаммов были выделены из мочи (64,8%), четверть – из мокроты (21,6%), значительно меньшей была доля изолятов из ран (11,4%), зева и носа (по 1,1%).

Результаты. Среди *E. coli* преобладали антибиотикорезистентные культуры, удельный вес которых составил 84,1%. Чаще встречались штаммы, устойчивые к ампициллину (75,0%) и ингибиторзащищенным пенициллинам – амоксициллину/клавуланату (72,7%) и тикарциллину/клавуланату (68,2%). Почти половина изолятов (45,5%) оказалась резистентна к цефалоспорином III (цефотаксиму и цефтазидиму) и IV (цефепиму) поколения. Около половины изученных штаммов проявляли устойчивость к фторхинолонам (51,1% – к ципрофлоксацину и 45,5% – к левофлоксацину). В три раза меньше был удельный вес культур, резистентных к амикацину (14,8%). Было выявлено только 5 штаммов эшерихий, нечувствительных к меропенему (5,7%). Более половины выделенных культур (57,9%) составили полирезистентные штаммы. Всего у эшерихий было выявлено 14 спектров антибиотикорезистентности, при этом чаще всего (29,5%) встречались изоляты с одновременной устойчивостью к восьми АМП (ампициллину, ингибиторзащищенным пенициллинам, цефалоспорином и фторхинолонам). Штаммы, резистентные ко всем десяти изученным АМП, составили 3,4%.

Выводы. Среди штаммов *E. coli*, выделенных в психиатрической больнице Санкт-Петербурга в 2014 г., преобладали антибиотикорезистентные культуры с высоким удельным весом полирезистентных штаммов. Наибольшую активность среди изученных АМП в отношении эшерихий проявляли амикацин (14,8% устойчивых культур) и меропенем, к которому было выявлено только 5 нечувствительных культур (5,7%).

Антибиотикорезистентность госпитальных штаммов стафилококков и ее динамика

Пилипенко С.Б.¹, Мамонова Е.А.¹, Голубева Ю.В.¹, Козлова Н.С.², Ингинен Д.В.², Разина А.А.²

¹СПБ ГКУЗ «Городская психиатрическая больница №3 им. И.И. Скворцова-Степанова», г. Санкт-Петербург;
²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», г. Санкт-Петербург

В настоящее время стафилококки по-прежнему занимают значительное место среди возбудителей госпитальных инфекций, при этом основным нозокомиальным патогеном является метициллинрезистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA), который наряду с устойчивостью ко всем бета-лактамам антибиотикам характеризуется полирезистентностью, то есть устойчивостью ко многим другим группам антимикробных препаратов с разными механизмами действия. В то же время значительно возросла роль метициллинчувствительных и метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков, особенно *Staphylococcus epidermidis*, который часто выделяют при инфекциях кровотока, менингитах, пневмониях и др.

Цель исследования. Определение чувствительности к антимикробным препаратам госпитальных штаммов стафилококков, выделенных от пациентов психиатрической больницы в 2014–2015 гг.

Материалы и методы. Была определена чувствительность 384 штаммов стафилококков (216 культур *Staphylo-*

coccus aureus и 168 штаммов *Staphylococcus epidermidis*), выделенных из разного материала пациентов с гнойно-септическими инфекциями психиатрической больницы, к 8 антибактериальным препаратам (АМП): пенициллину, оксациллину, ципрофлоксацину, левофлоксацину, амикацину, ванкомицину, сульфаметоксазолу/триметоприму, рифампицину. Определение чувствительности к АМП проводили согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04 от 2004 г. Более половины штаммов стафилококков были выделены из мокроты (68,2%), остальные – из ран (10,9%), носа (9,4%), мочи (6,2%), зева (4,4%), ликвора (0,5%), глаза (0,5%) и влажной поверхности (0,5%).

Результаты. Исследование показало, что 99,7% изученных культур оказались устойчивы хотя бы к одному антимикробному препарату, при этом среди стафилококков преобладали штаммы, устойчивые к пенициллину (97,7%) и оксациллину (79,4%). Меньшее число культур было резистентно к ципрофлоксацину (57,0%), сульфаметоксазолу/триметоприму (47,4%) и левофлоксацину (38,0%). Значительно реже встречались штаммы, устойчивые к амикацину (15,6%) и рифампицину (1,8%). Не было выявлено культур, устойчивых к ванкомицину.

Удельный вес культур, резистентных к пенициллину, ципрофлоксацину и левофлоксацину был почти одинаков у *S. aureus* и *S. epidermidis*, однако штаммы, резистентные к амикацину, встречались в пять раз чаще у *S. aureus* (25,5%), чем у *S. epidermidis* (4,8%), в то время как культур, устойчивых к сульфаметоксазолу/триметоприму, было более чем в два раза больше среди *S. epidermidis* (68,4%), чем *S. aureus* (31,0%).

Среди стафилококков чаще выявляли штаммы, устойчивые к трем (26,8%), двум (22,1%), четырем (18,8%) и пяти (17,4%) препаратам, при этом полирезистентные культуры (устойчивые к трем и более антимикробным препаратам разного механизма действия) составили 68,7%. Удельный вес метициллинрезистентных стафилококков был несколько выше среди *S. aureus* (82,9%), чем среди *S. epidermidis* (75,0%), однако количество полирезистентных культур среди метициллинрезистентных штаммов было больше у *S. epidermidis* (91,3%), чем у *S. aureus* (76,0%). Все полирезистентные культуры *S. aureus* оказались метициллинрезистентными, в то время как 10,2% полирезистентных штаммов *S. epidermidis* были чувствительны к метициллину. В целом удельный вес полирезистентных культур оказался выше среди *S. epidermidis* (76,2%), чем у *S. aureus* (63,0%).

У стафилококков было выявлено 29 спектров антибиотикорезистентности, 7 из которых вместе составили более трех четвертей (78,5%) от числа устойчивых штаммов. Наиболее распространенными среди стафилококков были культуры с одновременной устойчивостью к пенициллину и оксациллину (14,1%), пенициллину, оксациллину и сульфаметоксазолу/триметоприму (13,0%) и пенициллину, оксациллину и фторхинолонам (10,7%). Штаммы, устойчивые к 6 препаратам и чувствительные только к ванкомицину и рифампицину, составили 6% от общего числа резистентных культур.

Интересной представляется динамика чувствительности стафилококков к антимикробным препаратам в 2015 г. по сравнению с 2014 г. Так, в 2015 г. увеличился удельный вес метициллинрезистентных культур (с 74,7% до 85,6%), в боль-

шей степени за счет *S. epidermidis* (с 68,7% до 84,1%), а также штаммов, устойчивых к амикацину (с 13,8% до 19,8%). Если в 2014 г. только одна культура *S. epidermidis* была резистентна к рифампицину, то в 2015 г. было выявлено уже шесть штаммов, устойчивых к этому препарату, в том числе 2 культуры *S. aureus* и 4 штамма *S. epidermidis*. В то же время снизился удельный вес штаммов, резистентных к ципрофлоксацину (с 65,0% до 46,7%) и сульфаметоксазолу/триметоприму (с 50,2% до 43,7%), а также количество полирезистентных культур (с 72,3% до 64,1%). С 14,3% в 2014 г. до 3,9% в 2015 г. снизился также удельный вес полирезистентных метициллинчувствительных культур, которые, возможно, были вытеснены метициллинрезистентными. В 2015 г. был выявлен штамм *S. aureus*, устойчивый к семи из восьми изученных антимикробных препаратов, чувствительный только к ванкомицину, в то время как в 2014 г. такие культуры отсутствовали.

Выводы. Среди госпитальных штаммов стафилококков в психиатрической больнице преобладали антибиотикорезистентные культуры. Среди них был высок удельный вес метициллинрезистентных и полирезистентных штаммов, причем метициллинрезистентные культуры чаще встречались у *S. aureus*, а полирезистентные – у *S. epidermidis*. Наибольшую активность в отношении стафилококков проявляли ванкомицин, к которому не было выявлено устойчивых культур, и рифампицин (1,8% резистентных штаммов). Вариативность устойчивости стафилококков к антимикробным препаратам подтверждает необходимость проведения постоянного мониторинга их антибиотикорезистентности.

ПЦР-генотипирование ДНК параземолитических бактериофагов

Погожова М.П., Романова Л.В., Гаевская Н.Е.,
Бородин Т.Н., Тюрина А.В.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт»,
г. Ростов-на-Дону

Борьба с острыми кишечными инфекциями продолжает оставаться одной из важнейших задач современной медицины. Заболевание, вызываемое *Vibrio parahaemolyticus*, привлекает внимание исследователей в связи со вспышками токсикоинфекций, ассоциирующихся с загрязнением морепродуктов галофильными вибрионами. Несмотря на накопленный научный материал по изучению биологических свойств бактериофагов *V. parahaemolyticus*, многие вопросы их биологии и применения требуют дополнительных исследований.

Взаимоотношения бактериальных вирусов со штаммом-хозяином очень сложны, поэтому их идентификация и исследование структуры ДНК является актуальной проблемой.

Целью настоящего исследования явилась генотипическая характеристика ДНК бактериофагов параземолитических вибрионов в ОП-ПЦР.

Из лизогенных штаммов параземолитических вибрионов различного происхождения были выделены бактериофаги различных морфо- и серогрупп, ДНК которых исследовали в однопраймерной ПЦР (RAPD-анализ). В своих исследова-

ниях мы использовали набор универсальных праймеров (45, 1, 2, Д9А, 21, OPLZ 13, M 13, Ap7, pUC/M13 и WO).

Хромосомную ДНК бактерий выделяли из агаровой культуры с использованием протеиназы К (Serva, ФРГ). Качество нативной ДНК и результаты ПЦР контролировали электрофорезом в 5% полиакриламидном геле в аппарате для электрофореза типа «Midget» (Hofer Scientific Instrument, США) в присутствии маркеров, представляющих собой смесь MspI гидролизата плазмидной ДНК pUC19, Hind III и BglI-гидролизатов ДНК фага λ.

Аmplификацию проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, (Москва) в следующем режиме: 94°C (денатурация) – 15 сек; 42°C (отжиг) – 20 сек; 72°C (синтез) – 15 сек (всего 40 циклов). Инкубационная смесь (15мкл) для ПЦР содержала 20 mM трис-HCl, pH 8,6; 7 mM MgCl₂; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 0,5mM EDTA; 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, по 250 мкМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (Serva), 0,1-1,0 мкМ соответствующего праймера, 2 ед. Taq-полимеразы и 1–10 нг ДНК исследуемого фага.

В работе исследовали ДНК фагов параземолитических вибрионов (индикаторный штамм *Vibrio parahaemolyticus* KM-97): 7, 155, 616, 1154, выделенных из лизогенных штаммов, циркулирующих в Черном море (г. Новороссийск), 16763, 17036, 17078 в Азовском море (г. Бердянск) и 17722, 17748, 19152 (Приморье – г. Владивосток).

Исследования показали, что для дальнейшего изучения ДНК фагов параземолитических вибрионов лучше всего подходят праймеры 1, 2, Ap7, M13, OPLZ 13 и pUC/M13. Проведена генотипическая характеристика (паспортизация) каждого из изученных изолятов и выявлены отличия в генетической структуре бактериофагов. Исследование показало возможность применения ОП-ПЦР для углубленной генотипической характеристики ДНК бактериофагов, что позволит уточнить таксономию ряда новых фагов, имеющих сходный цикл развития, морфологию и антигенную структуру, и предложить новый подход к их классификации и идентификации.

Установлено, что использованные праймеры оказались способны амплифицировать последовательности хромосомной ДНК количеством от 21 до 1 и размером от 2356 до 100 п.н.

Разработка технологии получения колумбийского агара

Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В., Шепелин А.П.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

Кровяной агар – питательная среда для выделения прихотливых микроорганизмов как в клинической, так и в санитарной микробиологии. Кровяной агар готовят на основе плотных питательных сред, добавляя в них от 5 до 10% дефибринированной крови животных. Наиболее распространенной основой кровяного агара является коммерческая питательная среда колумбийский агар. Эта среда состоит из богатой белковой основы, натрия хлорида, крахмала и агара. В настоящее время в России рядом фирм-производителей осуществляется выпуск колумбийского агара с кровью, приготовленного на основе сухих сред иностранного

производства. Промышленное же изготовление этой среды в сухом виде в нашей стране отсутствует.

Цель работы. Разработать технологию производства колумбийского агара в виде сухой питательной среды на производственной базе ФБУН ГНЦ ПМБ.

Материалы и методы. В работе использованы компоненты, используемые при промышленном изготовлении питательных сред во ФБУН ГНЦ ПМБ. В качестве сред сравнения использованы колумбийские агары производства BBL и Mast Group. Оценку качества питательных сред проводили по физико-химическим и биологическим показателям. Биологические показатели экспериментальных сред и сред сравнения изучали на модели кровяного агара, приготовленного с добавлением 5% крови бараньей дефибринированной. В качестве тест-штаммов использовали микроорганизмы, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk».

Результаты. В ходе исследования разработан компонентный состав, который может быть использован при промышленном изготовлении колумбийского агара на производственной базе ФБУН ГНЦ ПМБ. В состав белковой основы входят панкреатический гидролизат казеина, пептон и экстракт пекарских дрожжей. Разработанная питательная среда не отличается от сред сравнения по физико-химическим показателям. Исследования, проведенные с использованием различных штаммов альфа-, бета- и гамма-гемолизирующих микроорганизмов, в частности, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *N. meningitidis*, а также стрептококков групп В, С, G и F, показали, что колонии всех исследованных микроорганизмов, выросшие на колумбийском агаре разработанного состава, крупнее, а зоны гемолиза у альфа и бета-гемолизирующих штаммов интенсивнее, чем у микроорганизмов, выросших на средах сравнения.

В настоящее время разрабатывается нормативно-техническая документация для производства колумбийского агара, сухого, а также планируется разработать технологию промышленного изготовления кровяного колумбийского агара в чашках Петри.

Совершенствование компонентного состава среды для культивирования молочнокислых бактерий

Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В., Шепелин А.П.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk

В связи с большим количеством заболеваний, передающиеся через пищевые продукты, обеспечение их микробиологической безопасности во всем мире имеет большую значимость. Основные схемы исследования качества изложены в соответствующих нормативных документах и ориентированы на классические культуральные методы с посевом на питательные среды. Поэтому расширение номенклатуры отечественных питательных сред является актуальной задачей.

В соответствии с ГОСТ 10444.11-2013 (ISO 15214:1998) и ГОСТ 10444.1-84 на микробиологический анализ пищевых продуктов одной из питательных сред, используемых для вы-

деления и культивирования молочнокислых микроорганизмов, является жидкая среда Бликфельдта. Питательная среда позволяет идентифицировать рост молочнокислых бактерий по изменению окраски среды с пурпурного на желтый, благодаря наличию в составе индикатора pH. Среда Бликфельдта состоит из пептона (5 г/л), лактозы (10 г/л), глюкозы (10 г/л), дрожжевого экстракта (4 г/л) и кислотно-основного индикатора бромкрезолового пурпурного (0,01 г/л). Среда, приготовленная по прописи в лабораторных условиях, имела бледно-голубой цвет и обеспечивала визуальное обнаружение роста исследованных штаммов лактобактерий в виде изменения цвета среды на серовато-желтый через 24–27 ч инкубирования при температуре 37°C из разведения 10^{-6} .

Увеличение концентрации бромкрезолового пурпурного до 0,025 г/л придало среде насыщенный пурпурный цвет, который изменяется на интенсивный желтый при снижении значения pH ниже 6,0 в процессе роста молочнокислых микроорганизмов. Замена пептона на панкреатический гидролизат казеина и добавление в среду твин-80 позволило увеличить скорость роста исследованных штаммов лактобактерий и повысить чувствительность питательной среды.

Бульон разработанного состава обеспечивает рост штаммов *Lactobacillus spp.* с изменением цвета питательной среды с пурпурного на желтый через 18–24 ч при посеве из разведения 10^{-7} и через 36–44 ч при посеве из разведения 10^{-8} , а также рост штаммов *Streptococcus thermophilus* с изменением цвета питательной среды с пурпурного на желтый и образованием осадка белого цвета при посеве из разведений 10^{-8} через 24 ч инкубирования.

Введение в состав среды агара в концентрации 0,9 г/л позволило визуализировать рост молочнокислых микроорганизмов в виде отдельных колоний с диффузным изменением окраски среды в зоне их роста с пурпурного на желтый, что позволяет проводить дифференциацию выросших бактерий от посторонних микроорганизмов.

Таким образом, разработаны две модификации среды Бликфильдта, отличающиеся от исходной среды более высокой чувствительностью и скоростью роста микроорганизмов, а также улучшенными дифференцирующими свойствами.

Обоснование выбора фотосенсибилизатора и условия антимикробной эффективности фотодинамической терапии при местных инфекционно-воспалительных процессах

Подпорин М.С.¹, Ипполитов Е.В.¹, Лабазанов А.А.¹, Самусенков В.О.², Царев В.Н.¹

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», г. Москва;

²ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», г. Москва

Методы эрадикации биопленок повсеместно находятся в начальной фазе исследования. Все чаще используемая методика фотодинамической обработки ран и местных воспалительных процессов, например, в полости рта, не под-

разумеает четкого выбора фотосенсибилизатора (ФС), что снижает эффективность данной методики, поскольку не учитывается характер микробного агента и его чувствительность к различным фотосенсибилизаторам, а также зависимость от экспозиции.

Цель. Провести сравнительный анализ деконтаминирующего действия фотодинамического воздействия с разными фотосенсибилизаторами для аппарата FotoSan (Нидерланды) на возбудителей неклостридиальной анаэробной инфекции полости рта и грибов рода *Candida* в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы. Для определения чувствительности выделенных штаммов анаэробных бактерий (*S. intermedius*, *S. sanguis*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*) и дрожжевых грибов к фотодинамическому воздействию применяли собственную модификацию метода серийных разведений – культивирование микроорганизмов после обработки проводили в биореакторе RiverSpinner (Латвия) в нескольких параллелях в условиях использования разных ФС и экспозиций облучения с длиной волны 436 нм. Интерпретацию результатов проводили по изменению оптической плотности при графическом отражении в виде кривых роста микробных популяций в реальном времени. Статистическую обработку результатов проводили по Манну-Уитни ($p \leq 0,05$).

Результаты. По результатам экспериментальных исследований кривых роста бактериальных и дрожжевых популяций отмечено статистически достоверное снижение количества жизнеспособных клеток использованных штаммов в разные фазы кривых роста. При анализе динамики роста выявлены различия в наступлении максимума размножения и его ингибирования у представителей разных видов. В отношении большинства анаэробных бактерий отмечен бактерицидный (за исключением *P. gingivalis*) и бактериостатический эффект в зависимости от вида ФС и экспозиции, для грибов *Candida* – только микостатический эффект, причем более чувствительными были представители видов *C. albicans*, *C. glabrata*, а *C. krusei* – напротив, резистентны.

Заключение. Применение разных видов ФС позволяет добиться наилучшего эффекта эрадикации патогена в зависимости от таксономического положения микроорганизма и экспозиции. Установлены различия антимикробной активности разных ФС – толуидинового синего, толония хлорида, фотоитазина в отношении различных таксонов микроорганизмов, а также эффективность применения фотодинамической терапии при разной экспозиции.

Анализ микробного разнообразия в точках ежегодного выделения *Vibrio cholerae* в Иркутской области и Забайкальском крае

Пономарева А.С., Миронова Л.В., Гладких А.С., Феранчук С.И., Балахонов С.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск

Ежегодное выделение микроорганизмов рода *Vibrio* в некоторых мониторинговых точках стало основанием для анализа полного метагенома данных объектов с целью опреде-

ления микробного окружения и определения вероятных экологических условий существования вибрионов в данных точках в течение ряда лет. В Иркутской области это места выделения вибрионов на реках Ангара и Иркут, в Забайкальском крае – на озере Кенон, рр. Ингода и Чита. Пробы отбирали в течение лета 2015 г., по 1 л с каждой точки, фильтровали через систему поликарбонатных фильтров. Выделяли тотальную ДНК с каждого фильтра и проводили амплификацию переменных участков 16S rRNA бактерий. Секвенирование библиотек ампликонов проводили на приборе GS Junior. Полученные данные обрабатывали с помощью программы mothur v.1.39, аннотацию осуществляли путем выравнивания на референсную базу последовательностей 16SrRNA Silva, кластеризацию в otu (оперативные таксономические единицы), и оценку видовой разнообразия проводили на уровне сходства 97%. Также был произведен расчет коэффициентов видовой богатства и разнообразия (Chao и Shannon index). Кластерный анализ микробиомов произведен с помощью метода UPGMA (невзвешенного попарного среднего) с использованием коэффициента общности образцов (Jaccard index).

Образцы кластеризовали по месту и времени отбора пробы. Shannon index колеблется в соответствии с уровнем разнообразия от 2,503 до 4,043. Среди проб из р. Ангара наибольший уровень разнообразия отмечен для первой декады августа (index Chao 311), наименьший – для марта (index Chao 123), что связано с ограничениями в развитии бактерий весной. В р. Иркут наиболее богатой в видовом отношении была проба, отобранная в конце июля. Среди проб из водоемов Забайкальского края, отобранных во вторую декаду июля, наибольшее видовое разнообразие наблюдали в пробе из оз. Кенон в месте сброса технических вод ГРЭС, наименьшее – из р. Чита, ниже сброса КНС «Каштак». Исследуемые микробные сообщества показывают динамичную изменчивость в зависимости от времени и места отбора пробы в соотношении основных фил – *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Actinobacteridae*. В сообществах меняется доля представителей класса *Gamma-proteobacteria*, начиная с конца июля до первой декады августа – уменьшается, со второй декады происходит увеличение числа представителей класса. Полученный массив данных о составе микробных сообществ в местах ежегодного обнаружения холерного вибриона открывает новые подходы к изучению экологии данного микроорганизма.

Опыт выделения вирусов Коксаки в Алтайском крае

Попова Л.В.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае», г. Барнаул

Вирусы Коксаки были описаны в 1948–1949 гг. Гилбертом Даллдорфом, исследователем из Нью-Йорка.

Вирус характеризуется быстрым распространением. Источником инфекции является человек – больной или носитель, от него вирус передается воздушно-капельным, контактно-бытовым, пищевым и водным путем. Инкубационный

период составляет от 1 до 10 дней, максимум 21 день. После перенесенного заболевания у человека появляется стойкий иммунитет к инфекции. Чаще всего вирус Коксаки поражает детей в возрасте до 10 лет, взрослых – редко.

Вирус Коксаки очень живуч. В водопроводной воде он сохраняется до 18 дней, в речной – месяц, в очищенных сточных водах – два месяца. Вирус устойчив к низким температурам: в холодильнике сохраняется нескольких недель. Вспышки энтеровирусных инфекций чаще происходят в летний период в местах концентрации детей и возле открытых водоемов.

В системе эпидемиологического надзора за энтеровирусными инфекциями в Алтайском крае вирусологической лаборатории отводится важная роль. За последние 3 года на энтеровирусы было обследовано 788 больных. Вирус Коксаки В за период 2014–2016 гг. был обнаружен у 3%. Выделенные вирусы распределились следующим образом.

В 2014 г. обследовано 285 больных на энтеровирусы, обнаружено вирусов Коксаки В – 11 штаммов; в 2015 г. – 309 больных, из них Коксаки В – 4; в 2016 г. – 194 больных, Коксаки В – 6.

С целью контроля за циркуляцией энтеровирусов во внешней среде в вирусологической лаборатории исследуются пробы сточной воды. Пробы доставляются по графику из определенных территорий Алтайского края, отбор производится с помощью пакета с макропористым стеклом, помещаемым в ток воды. За 2014–2016 гг. исследовано 973 пробы сточной воды, выделено 59 штаммов, из которых 36 штаммов полиовирусов, 22 штамма относятся к группе Коксаки В (37,2%).

В 2014 г. исследовано 289 проб сточной воды, выделен вирус Коксаки В – 3 штамма; 2015 г. – 319 проб, Коксаки В – 9; 2016 г. – 365 проб, Коксаки В – 10.

В 2016 г. специалистами службы проведен анализ результативности 15 точек отбора сточных вод, все точки отбора результативные.

Ведется систематический анализ материалов из объектов окружающей среды на энтеровирусы и представление результатов анализа с выводами и предложениями в Управление Роспотребнадзора по Алтайскому краю.

Выявление хронических бактерионосителей брюшного тифа на основе наличия антител к Vi-антигену *Salmonella typhi*

Порин А.А.^{1,2}, Кафтырева Л.А.^{1,2}, Егорова С.А.¹, Архипова А.В.², Демидова А.В.², Кузьмина К.А.²

¹ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», г. Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова», г. Санкт-Петербург

Брюшной тиф является антропонозной кишечной инфекцией, вызываемой возбудителем *Salmonella typhi* и способной к широкому эпидемическому распространению. После перенесенного брюшного тифа у 5–10% переболевших па-

циентов формируется хроническое бактерионосительство возбудителя брюшного тифа, нередко пожизненное. Известно, что у хронического бактерионосителя длительно сохраняются в сыворотке крови антитела к Vi-антигену возбудителя брюшного тифа *S. typhi*. У таких лиц проводится дополнительное исследование проб биоматериала (моча, испражнения, желчь). Выявление хронических бактерионосителей лабораторными методами (первичный скрининг) является одной из основных мер профилактики брюшного тифа. В последнее десятилетие в Российской Федерации большинство случаев брюшного тифа связано с завозом возбудителя туристами и рабочими мигрантами из стран, эндемичных по брюшному тифу.

Цель исследования. С целью выявления хронических бактерионосителей возбудителя брюшного тифа среди рабочих-мигрантов и жителей Санкт-Петербурга были исследованы в РНГА 356 сывороток крови: 106 проб, полученных от жителей Санкт-Петербурга (контрольная группа), и 250 проб, полученных от мигрантов, прибывших в Санкт-Петербург для длительного пребывания и трудоустройства (основная группа). Для исследования использовали диагностический набор для определения антител к Vi-антигену возбудителя брюшного тифа производства ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.

Результаты. При исследовании 106 сывороток контрольной группы во всех случаях в скрининговом разведении (1:40) был получен отрицательный результат. В основной группе (рабочие мигранты) в 24 пробах из 250 были обнаружены антитела к Vi антигену возбудителя брюшного тифа в скрининговых титрах, что составило 9,60%. При постановке количественного варианта реакции в 9 пробах сывороток (3,60%) уровень антител к Vi-антигену составлял 1:80.

Заключение. Детекция антител к Vi-антигену возбудителя брюшного тифа в диагностическом титре (1:40 и выше) свидетельствует о возможном хроническом носительстве *S. typhi*. Такие лица должны подлежать дополнительному лабораторному обследованию на брюшной тиф и диспансерному наблюдению. «Завоз» брюшного тифа с эндемичных территорий туристами и трудовыми мигрантами является важной эпидемиологической особенностью современного брюшного тифа в Российской Федерации.

Обеспечение безопасности донорской крови при решении проблемы распространения ВИЧ-инфекции в военно-медицинских учреждениях

Постников П.В.

ФГКУ «736 Главный центр Государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства обороны Российской Федерации», г. Москва

Важный аспект биобезопасности донорской крови и ее компонентов – отсутствие в них ВИЧ. Риск инфицирования реципиента при переливании ВИЧ-положительной крови – 99,9%. В Российской Федерации ежегодно регистрируются случаи заражения ВИЧ-инфекцией при переливании инфицированной ВИЧ донорской крови: 3–4 случая на 3 млн

трансфузий (2 случая при переливании компонентов крови от доноров реципиентам в первом полугодии 2017 г.).

Для изучения биобезопасности донорской крови нами использовались данные формы №4 «Сведения о результатах исследования крови на антитела к ВИЧ», утвержденной постановлением Госкомстата России №30, о распространенности ВИЧ в образцах донорской крови (в единицах на 100 тыс. образцов), исследованной в лабораториях инфекционной иммунологии лечебно-профилактических учреждений Минобороны России в период 2012–2016 гг. Для сравнения использовались аналогичные данные МО РФ за 2007–2011 гг. и данные информационных бюллетеней Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом о распространенности ВИЧ в донорской крови в западноевропейских странах, странах бывшего СССР и Российской Федерации.

Достоверно установлено, что распространенность ВИЧ в образцах донорской крови, заготовленной в лечебно-профилактических учреждениях Минобороны России и исследованной методом ИФА, снизилась в 2,5 раза. Это главным образом обусловлено повышением уровня барьерной профилактики (снижение частоты заноса ВИЧ при призыве) в результате реализации распоряжений местных органов власти в наиболее пораженных регионах об обязательном тестировании на выявление ВИЧ призывного контингента, а также Постановления Правительства РФ от 4.07.2013 г. №565 «Положение о военно-врачебной экспертизе» (вступило в силу 01.01.2014 г.), предусматривающего обязательное обследование призывников перед службой в армии на этапе прохождения военно-врачебной комиссии в военкомате. В связи с чем доля данной категории среди ВИЧ-положительных уменьшилась с 92% в 2001 г. до 19–24% в 2015–2016 гг.

Штамм *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью: вирулентность на мышинной модели и генетические характеристики

Потапов В.Д., Комбарова Т.И., Грищенко Н.С., Богун А.Г., Мухина Т.Н., Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Благодатских С.А., Детушев К.В., Дятлов И.А.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk

Высокий уровень заболеваемости туберкулезом (ТБ) сочетается с высоким уровнем смертности – в среднем в мире он составляет 16%. При этом все больше нарастает значимость ТБ, вызванного множественно-устойчивыми вариантами возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*. В РФ в 2016 г. у 35% госпитализированных туберкулезных пациентов выявлен ТБ с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ), что указывает на существенный рост данного показателя по сравнению с 2014 г., когда он составлял 7%.

Цель данной работы – изучение культурально-морфологических, патогенетических и молекулярно-генетических особенностей клинического штамма *M. tuberculosis* «Ростов», выделенного в Республике Дагестан в ноябре 2013 г., опре-

деление его уровня лекарственной устойчивости и принадлежности к генетическому семейству.

Микобактерии выращивали на питательной среде Middelbrook 7H9 (Himedia, Индия) с добавкой 10% ADC (BD, США) и 0,05% Твина 80 с аэрацией в течение 21 дня при температуре 37°C. Идентификацию микроорганизмов проводили на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Лекарственную чувствительность культур микобактерий к противотуберкулезным препаратам изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу, амикацину, канамицину, капреомицину и офлоксацину определяли с помощью «Набора питательных сред для ускоренного определения лекарственной чувствительности и первичной идентификации микобактерий туберкулеза» и «Набора питательных сред для диагностики XDR-туберкулеза» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия). Вирулентность штамма определяли на мышях линии С57BL. В качестве контрольного использован штамм *M. tuberculosis* H37Rv. Генотипирование штамма проводили методом MIRU-VNTR-типирования, сполитипирования и ДНК-фингерпринтинга.

На основании проведенных исследований показано, что выделенный от человека в штамм *M. tuberculosis* «Ростов» относится к семейству Beijing (Пекин). Экспериментально установлена его более высокая вирулентность для мышей линии С57BL по сравнению с лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, что выражается в более быстром и необратимом истощении животных; в большей степени обсемененности микобактериями органов экспериментальных животных; в наиболее выраженной гистологической картине патологических изменений внутренних органов животных; в отсутствии защитной реакции макроорганизма в виде клеточного иммунитета на данный патоген. Важной особенностью штамма *M. tuberculosis* «Ростов» является его высокая скорость размножения на жидких питательных средах.

Применение полногеномного секвенирования для генетической и эпидемиологической характеристики штаммов *Shigella sonnei*

Пошвина Д.В.¹, Борисов С.Д.², Якубович И.С.³, Хлопко Ю.А.¹, Плотников А.О.^{1,4}, Черкасов С.В.¹

¹ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уральского отделения РАН, г. Оренбург;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Оренбургской области», г. Оренбург;

³Управление Роспотребнадзора по Оренбургской области, г. Оренбург;

⁴ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», г. Оренбург

В настоящее время большое значение в клинической диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями придается молекулярно-генетическим методам исследования. Особое место занимают методы, основанные на секвенировании нуклеиновых кислот, в том числе полногеномное секвенирование, позволяющее выявлять и описывать особенности генома известных и неизвестных

бактерий, оценивать штаммовые различия и осуществлять мониторинг генетической variability патогенов. В Российской Федерации шигеллез продолжают занимать одно из ведущих мест в этиологической структуре заболеваемости острыми кишечными инфекциями.

С целью оценки возможностей полногеномного секвенирования для генетической и эпидемиологической характеристики эпидемических штаммов были использованы культуры *Shigella sonnei*, выделенные во время вспышки шигеллезной инфекции.

В работе использовали эпидемиологические, микробиологические, молекулярно-генетические и биоинформатические методы анализа. Из четырех культур выделили ДНК, приготовили ДНК-библиотеки и провели полногеномное секвенирование на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН.

В результате проведенной работы дана фенотипическая и геномная характеристика штаммов *Shigella sonnei*, выделенных при вспышке дизентерии в Оренбургской области в 2016 г. Проведенный анализ показал высокую степень родства геномов исследуемых штаммов шигелл. Данное обстоятельство в совокупности с фенотипическими характеристиками свидетельствует о высокой степени генетического родства всех исследуемых изолятов. При изучении нуклеотидных последовательностей штаммов *S. sonnei* выявлена практически полная идентичность сравниваемых последовательностей генов рPHK – 16S, 23S, 5S, а также межгенных спейсеров ITS1 и ITS2. Установлено, что в геномах исследуемых штаммов шигелл присутствуют гены, кодирующие синтез основных факторов вирулентности, а также генетические детерминанты устойчивости к различным группам антибактериальных препаратов. Характеристика геномов и оценка генетического разнообразия штаммов шигелл помогает в установлении степени генетической однородности/неоднородности штаммов, выделенных при локальной вспышке и оценке их патогенного потенциала.

Микробные ассоциации при акне у взрослых

Примак Т.Д.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», г. Чита

Проблема угревой сыпи (акне) по-прежнему является актуальной и широко распространенной среди взрослого населения (Кубанова А.А. и соавт., 2003; Акышбаева К.С. и соавт., 2015; Niranikar S., 2017). В составе микробиоценозов кожи лица обнаруживаются бактерии рода стафилококков, пропионибактерии. С целью коррекции данного биотопа применяются преимущественно антимикробные препараты, фитосредства и физиотерапия. Однако причина значительного микробного числа в кожных фолликулах лицевой области при акне до сих пор не известна.

Для выяснения микробных ассоциаций смежных биотопов – кишечника и ротоглоточного кольца нами было проведено исследование на выявление *Giardia lamblia*, *Crypto-*

sporidium parvum в содержимом кала одновременно с определением антигенов *Helicobacter pylori* (Hр) методом iCHECK – одностадийным иммунохроматографическим анализом для качественного выявления микроорганизмов в кале («Sertest-Biotec», Испания). Обследование включало бактериологическое исследование фекалий и ротоглотки на аэробные и анаэробные микроорганизмы. Опытную группу составили 32 взрослых возраста 18–36 лет, у которых отмечался стойкий воспалительный процесс в течение 2 лет и более.

Из числа обследованных 22 (68,8%) человека составили женщины. Присутствие Hр обнаружено у 18 (56,3%), лямблиоз – у 18 (56,3%), криптоспориоз – у 6 (18,8%) человек. В ходе бактериологического исследования кишечного биотопа *S. aureus* выделен у 16 (50%) человек, измененная *Escherichia coli* – у 27 (77,1%), в единичных случаях обнаружены *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* и *Proteus mirabilis*. Одновременное определение видового разнообразия ротоглоточного биолокуса выявило на фоне увеличения микробного числа стафилококков присутствие измененной и неизмененной *E. coli* у 30 человек (93,8%), *Enterococcus faecalis* у 28 обследованных (87,5%), являющиеся представителями аутофлоры, но не доминантами ротоглоточного биотопа.

Таким образом, у взрослых ассоциация *H. pylori* с кишечными простейшими, кишечной палочкой и энтерококками обнаружена в большинстве случаев акне, и присутствие воспалительных изменений в форме угревой сыпи на лице связано не только с резидентными микробами кожи, но и кишечными ассоциантами из смежных биотопов.

Этиологическая структура инфекционных осложнений у пациентов

Пхакадзе Т.Я., Чурсина Н.И.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова», г. Москва

Решение проблемы этиологической диагностики, профилактики и лечения инфекционных осложнений в травматологии и ортопедии существенным образом зависит от эффективного микробиологического мониторинга.

Цель. Определить видовой состав и антибиотикорезистентность микроорганизмов, выделенных из материала травматологических и ортопедических больных.

Материал и методы. В лаборатории микробиологии ЦИТО в течение 2016–2017 гг. проведено исследование 3481 образца материала от 2132 пациентов 12 клинических отделений. Наиболее частыми и диагностически значимыми видами исследуемого материала, общее число образцов которых равнялось 3272, являлись: раневое отделяемое – 1472, суставная жидкость – 888, операционный материал – 717, кровь из вены – 195 образцов. Материал от больных исследовали на всех этапах пребывания пациентов в стационаре. Для проведения микробиологических исследований применяли современное лабораторное оборудование, качественные питательные и дифференциально-диагности-

ческие среды, позволяющие выявить как аэробные, так и анаэробные бактерии и грибы. Для культивирования образцов крови из вены и суставной жидкости использовали анализатор VacT/ALERT 3D 60 (bioMérieux, Франция). Для идентификации микроорганизмов и определения их антибиотикорезистентности – анализатор VITEK 2-compact (bioMérieux, Франция). Следует подчеркнуть, что наличие экспертной системы в анализаторе VITEK 2-compact позволяло получать информацию также о минимальной подавляющей концентрации антибиотиков (МПК) и о механизмах резистентности бактерий. Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы «Микроб 2». Провели сравнительную оценку частоты выявления отдельных групп микроорганизмов по годам. Обязательным условием деятельности лаборатории микробиологии считали непосредственный и постоянный контакт с отделениями клиники от момента взятия образца до выдачи окончательного результата.

Результаты. В результате исследования 3481 образца материала от больных изолировали 1338 культур микроорганизмов, относящихся к 63 видам, в соответствии со статистическим анализом. Из них 1181 культура обнаружена в виде ассоциаций. По данным эпидемиологического анализа, исключающего повторный учет идентичных видов от одного и того же больного, число культур равнялось 878. В видовой структуре, как обычно, преобладали грамположительные кокки, составившие 565 культур (64%). Из них на долю *S. aureus* приходилось 239 штаммов (27,2%), на долю коагулазонегативных стафилококков – 215 (24,5%), что составило в сумме 51,7%. Частота выявления бактерий семейства *Enterobacteriaceae* составила 15%. В 2007 г. этот показатель равнялся 5,7%, и с тех пор постоянно увеличивался. В то же время частота обнаружения группы неферментирующих грамотрицательных бактерий, в частности, *P. aeruginosa* и *Acinetobacter spp.*, сократилась с 25,6% в 2007 г. до 14,9% в 2015–2016 гг. Традиционно нечасто обнаруживали грибы, представленные преимущественно родом *Candida*, и анаэробные бактерии, составившие соответственно 0,9% и 0,5% культур. Анализ антибиотикорезистентности клинически значимых видов микроорганизмов продемонстрировал следующее. Частота выявления культур метициллинрезистентного стафилококка составила 19% из числа *S. aureus* и 49% из числа коагулазонегативных стафилококков. Этот показатель для *S. aureus* оказался ниже по сравнению с 2007 г., когда 58,3% культур *S. aureus* являлись MRSA. Для коагулазонегативных стафилококков данные двух сравниваемых периодов были идентичными – 49% и 46,7% соответственно. Важнейшими критериями оценки антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий является их отношение к цефалоспорином 3 поколения и карбапенемам. 62% культур *E. coli* и 80% *K. pneumoniae* были устойчивы к цефтазидиму. 28% штаммов *P. aeruginosa* и 42% *A. baumannii* были резистентны к карбапенемам.

Выводы. Проведение микробиологического исследования материала от больных в травматолого-ортопедическом стационаре позволяет определить этиологический агент инфекционного осложнения и его отношение к антибиотикам с определением МПК препарата, что способствует, прежде всего, выбору оптимального средства для проведения антимикробной терапии.

Полиморфизм штаммов *M. tuberculosis* линии Beijing, выделенных в центральной части Ханты-Мансийского автономного округа – Югра

Решетникова Ю.В.¹, Андреевская С.Н.², Ларионова Е.Е.², Смирнова Т.Г.², Черноусова Л.Н.²

¹КУ ХМАО-Югры «Ханты-Мансийский клинический противотуберкулезный диспансер», г. Ханты-Мансийск;
²ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва

Для изучения полиморфизма штаммов *M. tuberculosis* (МБТ) линии Beijing были изучены фенотипическая лекарственная устойчивость (ЛУ) к 8 ПТП на питательных средах, функционально-нейтральный полиморфизм 95 кодона гена *gyrA* и мутации в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам (на биологических микрочипах «ТБ-Биочип-1» и «ТБ-Биочип-2» (БИОЧИП-ИМБ, Россия)). Работа проведена на 177 штаммах микобактерий туберкулеза (МБТ) линии Beijing, выделенных в центральной части ХМАО. По структуре 95 кодона *gyrA* штаммы линии Beijing были разделены на две клады, различающиеся по своей распространенности в популяции и по характеру лекарственной резистентности. Штаммы клады А имели характерную для линии Beijing последовательность *gyrA95*_ACC (Thr) – 152/177 (85,88%). Среди МБТ клады А редко выявлялись штаммы с фенотипической лекарственной чувствительностью (15/152, 9,87%). У штаммов этой клады был представлен широкий спектр мутаций во всех генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам. Преобладали штаммы с генотипической и фенотипической множественной ЛУ (МЛУ) (110/152, 72,37%), преимущественно с сочетанием мутаций *katG* 315_Ser->Thr + *groB531*_Ser->Leu (72/110, 65,45%). Для штаммов клады В (25/177, 14%) была характерна последовательность *gyrA95*_AGC (Ser), часто встречались чувствительные ко всем препаратам штаммы (9/25, 36%). Спектр мутаций в *groB* гене был крайне ограничен, не выявлено ни одного штамма с устойчивостью к офлоксацину. Очевидно, клада В возникла сравнительно недавно, т.к. редко встречается в популяции и ограниченно распространена в ряде районов, особенно среди сельского населения. Скорее всего, она происходит от чувствительного клона клады А, в пользу чего свидетельствует высокое число чувствительных штаммов и широкий разброс спектров резистентности, которые могли возникнуть независимо вследствие неадекватной терапии.

Аутомикрофлора кожи при некоторых ревматических заболеваниях

Романов В.А., Иванов Д.В.

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», г. Ярославль

При ревматических заболеваниях внимание исследователей микробиоты сосредоточено преимущественно на изменениях микрофлоры кишечника. Представляло интерес изу-

чение микробиоценозов открытых участков тела при этой форме патологии.

Цель работы – оценка состояния аутомикрофлоры поверхностных биотопов у больных системной красной волчанкой (СКВ), системной склеродермией (ССД), ревматоидным артритом (РА).

Обследовано 24 больных СКВ, 8 – ССД, 11 – РА и в качестве группы сравнения – 20 больных сердечно-сосудистыми заболеваниями из тех же стационаров. У всех пациентов исследовали аутомикрофлору слизистых оболочек носа и зева, участки пораженной и непораженной кожи.

В аутомикрофлоре слизистой оболочки полости носа при СКВ установлено преобладание стафилококков с доминированием золотистого стафилококка на фоне уменьшения видового и родового представительства аутомикрофлоры. При минимальной степени активности (AI) СКВ слизистая оболочка носа и зева контаминированы *S. aureus* у 40% больных, поверхностей кожи предплечья – у 20%. При умеренной степени активности (AII) соответствующие поверхностные биотопы были колонизированы золотистым стафилококком в 63%, 31%, 42% и 76% случаев. Поверхности сосудистой «бабочки» и экзантемы у больных СКВ с минимальной степенью активности патологического процесса были обсеменены *S. epidermidis* в 100% случаев, *S. hominis* – в 50%, микрококком в 100%, Гр(+) спорообразующими палочками в 50%, а экзантема – *S. arlettae* в 50%.

Микрофлора интактной кожи у больных ССД была представлена *S. epidermidis* (62%), реже *S. aureus* (50%), *S. saprophyticus* (37%); *S. hominis*, *S. arlettae*, *C. xerosis* и Гр(+) спорообразующие палочки были выделены в 25% случаев; 62% лиц являлись носителями микрококка. У четверти всех ССД больных с поверхности кожного покрова предплечья изолировались коринеформные бактерии и Гр(+) спорообразующие палочки.

Микрофлора кожи больных РА была представлена 6 видами бактерий, наиболее часто высевался эпидермальный (90%), реже – золотистый стафилококки (27%). В 45% кожа была контаминирована *S. hominis*, в 27% – *S. warneri*. Микрококки и Гр(+) спорообразующие палочки на поверхности кожного покрова предплечья обнаруживались с одинаковой частотой (18%). При трофических язвах голени у всех пациентов был выделен *S. epidermidis*, реже – *S. aureus*.

Вопросы непрерывного медицинского образования в подготовке врача-бактериолога

Романов В.А., Малафеева Э.В., Богомолова Н.С., Романычева А.А., Семечкин Н.В.

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», г. Ярославль

Совершенствование системы медицинского образования потребовало пересмотра образовательных программ. Опираясь на действующую законодательную базу, для врачей-бактериологов введено обязательное постоянное обучение по программам повышения квалификации, которое начинается после получения специальности и продолжается в течение

всей трудовой деятельности. Непрерывное медицинское образование базируется на основе партнерства государственных бюджетных образовательных учреждений и профессиональных обществ. В этом плане при подготовке бактериологов большая роль отводится кафедрам микробиологии медицинских вузов, на базе которых врачи имеют возможность получать обучение на дискретных (прерывистых) циклах. Проведение на кафедре циклов трудоемкостью 36 академических часов по теме: «Методы микробиологического исследования» показало заинтересованность и высокую образовательную активность врачей. Для проведения данных циклов кафедра располагает учебно-методическими материалами по всем разделам (модулям) дисциплины, учебно-методической литературой для самостоятельной работы слушателей, материально-технической базой, обеспечивающей организацию всех видов подготовки врачей бактериологов. Успешное обучение по этой программе позволяет совершенствовать универсальные, общепрофессиональные, профессиональные компетенции, расширить профессиональные знания и умения. Для подведения итогов проведения прерывистого цикла эффективно используются текущие и рубежные тестовые задания по изученным темам. Учитывая формирование врачами индивидуальных планов непрерывного образования на пятилетний срок, кафедрам необходимо разработать планы проведения циклов по актуальным темам с ежегодным обновлением их тематики. Кафедры микробиологии медицинских вузов имеют все условия для обеспечения модернизации системы последипломного образования врачей бактериологов и должны активно заниматься образованием и повышением квалификации врачей. Обучение врачей на дискретных циклах кафедр микробиологии наряду с участием в образовательных мероприятиях с использованием дистанционных технологий (вебинары, заочные образовательные мероприятия) позволит врачам бактериологам в полном объеме выполнить индивидуальный план непрерывного медицинского образования пятилетнего цикла обучения.

Тяжелые случаи заболевания гриппом в 2015–2016 и 2016–2017 гг.

Святченко С.В., Дурьманов А.Г., Рыжиков А.Б., Ильичева Т.Н.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

Целью исследования явился анализ двух эпидемических сезонов по гриппу – 2015–2016 гг. и 2016–2017 гг. Эпидемии отличались по доминирующему субтипу вируса гриппа А, времени начала эпидемии, ее продолжительности, количеству случаев тяжелого течения заболевания, смертности от гриппа.

Эпидемия 2015–2016 гг. в России началась резким подъемом заболеваемости на второй неделе 2016 г. и к 12-й неделе завершилась. Весь эпидемический сезон доминировал А(Н1N1 pdm09) субтип вируса гриппа, который вызвал повышенное количество заболеваний, характеризовавшихся тяжелым течением, 501 смертельный исход был подтвержден лабораторными исследованиями.

Эпидемический подъем заболеваемости в 2016–2017 гг. в России начался на 48–49-й неделях 2016 г. Во время эпидемии было два доминирующих типа/субтипа вируса гриппа: до 7-й недели преобладал вирус гриппа А(Н3N2), с 8-й недели – вирус гриппа В. Эпидсезон 2016–2017 гг. был более длительным, чем предыдущий, однако подъем заболеваемости был менее резким, и было значительно меньше случаев смерти от гриппа.

Среди лиц, перенесших тяжелую форму гриппа в 2015–2016 гг., было 297 детей и подростков до 16 лет включительно, 142 беременные женщины. Из 1298 человек, образцы от которых поступили в ГНЦ ВБ «Вектор», в группы риска входили 60%, и подавляющее большинство этих людей не были вакцинированы. Среди пациентов, умерших от гриппа в 2016 г., вакцинированные составили 2%.

В сезон 2016–2017 гг. среди 428 пациентов с тяжелой формой гриппа 119 были вакцинированы накануне эпидсезона. Анализ противогриппозных вакцин, проведенный Европейским центром контроля заболеваемости в отношении вируса гриппа А(Н3N2) в Канаде, США и Европе, продемонстрировал недостаточную эффективность вакцин (42%, 43%, 38% соответственно). Очевидно, что антигенный дрейф вируса гриппа А(Н3N2) привел к тому, что вакцинный штамм A/HongKong/4801/2014 не обеспечил высокий уровень специфического иммунитета у вакцинированного населения. Известно, что скорость антигенного дрейфа вируса А(Н3N2) превосходит скорость дрейфа других вирусов, циркулирующих в настоящее время в человеческой популяции, поэтому его гораздо чаще приходится менять в составе трехвалентной вакцины. Тем не менее, несмотря на то что вакцина оказалась недостаточно эффективной, в сезоне 2016–2017 гг. в России не было ни одного случая смерти от гриппа, подтвержденного лабораторными исследованиями, среди лиц, вакцинированных осенью 2016 г. Это указывает на необходимость вакцинации, даже если эффективность вакцины снижена.

Идентификация штаммов туляремийного микроба из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий "Микроб"» с помощью молекулярно-биологических методов

Сеничкина А.М., Осина Н.А., Осин А.В.,
Абдрашитова А.С., Ляшова О.Ю.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Саратов

Туляремия распространена повсеместно, в том числе на территории Российской Федерации (РФ). Возбудитель туляремии *F. tularensis* включает подвиды: *tularensis*, *holarctica* (биовары: *Ery^s*, *Ery^r*, *japonica*), *mediaasiatica*, *novicida*. Патогенность *F. tularensis* для человека зависит от его подвида. Поэтому очевидна необходимость определения подвидовой принадлежности выделенных культур патогена.

Для внутривидовой дифференциации штаммов туляремийного микроба широкое применение получили молекулярно-генетические методы, такие как определение вариабельности локусов FT-M19, *ISFtu2*, RD1-области методом ПЦР, рекомендованные ВОЗ [WHO, 2007], RAPD-ПЦР со случайным праймером, предложенная референс-центром по туляремии в РФ [Вахрамеева Г.М. и др., 2011]. Помимо этого, нами была разработана ПЦР для определения всех подвидов и японского биовара *F. tularensis*, где в качестве ДНК-мишеней выступали локусы FTT1122, FTT1067c, FTT1670c, *ISFtu2* [Сеничкина А.М. и др., 2017]. Показана возможность определения подвидов туляремийного микроба с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии [Афанасьев М.В. и др., 2015]. Однако данных о молекулярных профилях штаммов *F. tularensis* из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий (ГКПБ) "Микроб"» недостаточно.

Цель работы – изучение коллекционных штаммов *F. tularensis* с помощью молекулярно-биологических методов.

Для этого у 116 штаммов туляремийного микроба из ГКПБ «Микроб» была изучена вариабельность RD1-области, наличие INDEL-маркеров, характерных для каждого подвида, и белковые масс-спектры.

Установлено, что на основании анализа RD1-области из 116 культур патогена 8 идентифицированы как *F. tularensis tularensis*, 99 – *F. tularensis holarctica Ery^{s/r}*, 5 – *F. tularensis holarctica japonica*, 2 – *F. tularensis mediaasiatica*, 2 – *F. tularensis novicida*. Результаты, полученные при использовании ПЦР на основе локусов FTT1122, FTT1067c, FTT1670c, *ISFtu2*, были аналогичными.

При масс-спектрометрии штаммов *F. tularensis* выявлены белковые профили, специфичные для каждого подвида патогена, что полностью совпало с результатами ПЦР.

Таким образом, проведена подвидовая и биоварная идентификация штаммов *F. tularensis* из ГКПБ «Микроб» с помощью молекулярно-биологических методов. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения ПЦР в комплексе с масс-спектрометрией при определении подвидовой принадлежности выделенных культур туляремийного микроба, что является необходимым при их паспортизации в коллекциях патогенных бактерий.

Колицинпродуцирующие антибиотикорезистентные уропатогенные штаммы *Escherichia coli*, выделенные в Ярославле в 2016–2017 гг.

Слукин П.В.¹, Ермоленко З.М.¹, Асташкин Е.И.¹,
Федюкина Г.Н.¹, Фурсова Н.К.¹, Ершова М.Г.²,
Полетаева Е.Д.², Шепелин А.П.¹

¹ФБУН ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск;

²ГУЗ ЯО «Инфекционная клиническая больница №1», г. Ярославль

Цель. Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика колицинпродуцирующих антибиотикорезистентных уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных в г. Ярославле в 2016–2017 гг.

Материалы и методы. Коллекция уропатогенных штаммов *E. coli* ($n = 20$) выделена из мочи пациентов клиник г. Ярославля в 2016–2017 гг. Бактериальные клетки выращивали на плотной питательной среде Mueller Hinton Agar (HiMedia, Индия) и жидкой питательной среде ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Для получения полужидкого агара использовали «Агар микробиологический» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Видовая идентификация проведена на основании биохимических тестов и на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Чувствительность к антибактериальным препаратам (АП) четырех функциональных классов (бета-лактамам, фторхинолонам, аминогликозидам и фосфомицинам) определяли методом микроразведений в бульоне. Анализ колицинчувствительности проводили методом двухслойного агара (Методические указания Минздрава СССР 17.12.1984 №04-723/3). В качестве колицинчувствительного индикаторного штамма использовали штамм *E. coli* С600, обладающий чувствительностью к широкому спектру колицинов. Генетические детерминанты вирулентности (*fimH*, *hlyA*, *cnf1*, *iroN*, *fyuA*, *iutA*, *sfaS*, *focG*, *ompT*, *papGII*, *papGIII*, *traT*, *kpsMTII*, *usp*, *cvaC*, *PAI/malX*, *afa/draBC*), антибиотикорезистентности (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, интегроны классов 1 и 2) и принадлежность штаммов к O-группам детектировали методом ПЦР. Генотипирование штаммов осуществляли методом RAPD-PCR со «случайными» праймерами OPA 11, Wil 2 и 1247. Секвенирование последовательностей ДНК генов проводили в ООО «СИНТОЛ» (Москва), анализировали с помощью программ Vector NTI, Chromas и BLAST и размещали в базе данных GenBank.

Результаты. 20 неповторяющихся изолятов *E. coli* выделены из мочи 20 пациентов урологических отделений лечебных учреждений г. Ярославля в декабре 2016 г. – январе 2017 г. Среди них идентифицировано 18 антибиотикорезистентных штаммов, среди которых 4 штамма являлись полирезистентными, устойчивыми к 3 и более функциональным классам АП (MDR-штаммами). По комбинации генов вирулентности штаммы отнесены к 18 генотипам, по наборам генов антибиотикорезистентности – к 6 генотипам, по характеру RAPD-профилей – к 19 генотипам. Определена принадлежность 12 штаммов к семи O-группам: O2 ($n = 2$), O4 ($n = 3$), O6 ($n = 1$), O15 ($n = 1$), O18 ($n = 2$), O25 ($n = 2$) и O75 ($n = 1$).

При анализе коллекции выявлены два штамма, являющихся колицинпродуцирующими – *E. coli* U14 и *E. coli* U15, которые были идентифицированы по наличию зон торможения роста индикаторного штамма *E. coli* С600 шириной 9 и 11 мм соответственно. Оба штамма были выделены от пациентов с хроническим циститом и были устойчивы к бета-лактамам (ампициллину, амоксиклаву, амоксициллин/сульбактаму, цефтриаксону и цефуроксиму). В штамме *E. coli* U14 идентифицированы ген *bla_{TEM}* и интегрон класса 1 без генных кассет. Штаммы отнесены к разным «генотипам вирулентности», т.к. имеют различающиеся наборы генетических детерминант вирулентности. Штамм *E. coli* U14 несет 7 генов вирулентности, а штамм *E. coli* U15 – 13 генов вирулентности. Интересно, что оба штамма имели пять общих генов вирулентности: ген адгезина фимбрий I типа *fimH*, гены рецепторов сидерофоров *iroN* и *fyuA*, ген белка внешних мембран *ompT* и ген *traT*, обеспечивающий резистент-

ность патогенных бактерий к бактерицидному действию сыворотки крови. Штамм *E. coli* U14 дополнительно имел ген *iutA* сидерофора азобактина и ген *cvaC*, кодирующий колицин V. Штамм *E. coli* U15 отличался наличием у него гена *usp*, специфичного белка для уропатогенных эшерихий, трех генов – *sfaS*, *focG* и *papGIII* – фимбриальных адгезинов, гена *kpsMTII*, участвующего в образовании капсулы II группы, двух генов *hlyA* и *cnf1*, кодирующих токсины α -гемолизин и цитотоксический некротический фактор соответственно; а также остров патогенности PAI/malX. Штамм *E. coli* U15 отнесен к O-группе O2, а принадлежность штамма *E. coli* U14 к какой-либо O-группе с помощью использованного набора праймеров не определена. Внутривидовое генотипирование показало, что RAPD-профили по трем праймерам у этих двух штаммов существенно отличались друг от друга, что позволило отнести их к разным генотипам.

Последовательности генов вирулентности и антибиотикорезистентности из референс-штаммов и из клинических штаммов изучаемой коллекции размещены в международной базе данных GenBank: *fimH* [KY007009, KY007010, KY007011]; *traT* [KY020406, KY020407], *sfaS* [KY084254], *iutA* [KY293685, KY293686], *ins1* [MF435915, MF447886], *hlyA* [MF495345], *iroN* [MF495346], *fyuA* [MF495347], *ompT* [MF495348], *kpsMTII* [MF495349], *usp* [MF495350], *PAI/malX* [MF495351], *afa* [MF495352].

Выводы. Анализ коллекции уропатогенных изолятов *E. coli*, выделенных в Ярославле в 2016–2017 гг., показал, что подавляющее большинство из них являлись антибиотикорезистентными патогенами. Среди них выделены два штамма, которые продуцировали колицин – один из важных факторов вирулентности уропатогенов и были резистентны к бета-лактамам. Молекулярно-генетические исследования показали значительные различия между этими штаммами. Обращает на себя внимание наличие у обоих штаммов большого количества генетических детерминант вирулентности, в том числе кодирующих адгезины, сидерофоры, токсины, капсулообразование, резистентность к бактерицидному действию сыворотки крови и др. Комплексный подход изучения уропатогенных эшерихий позволит определить молекулярные механизмы развития патогенных свойств и антибиотикорезистентности у данной группы бактерий.

Антибактериальное действие наночастиц на керамическом носителе на грамположительные и грамотрицательные бактерии

Слукин П.В., Ермоленко З.М., Фурсова Н.К., Игнатов С.Г.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

Одной из важнейших проблем здравоохранения во всем мире в последние десятилетия является нарастающая устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний человека к антибактериальным препаратам. В связи с этим широким фронтом ведутся работы по поиску новых подходов к преодолению резистентности патогенов. Одним из направлений является создание новых материалов для изготовления

медицинских изделий, обладающих антибактериальными свойствами. Это важно для обеспечения эффективности манипуляций в хирургии, трансплантологии, стоматологии, урологии и других областях медицины.

Целью данной работы была оценка антибактериальной активности наночастиц, содержащих атомы металлов в разных комбинациях, иммобилизованных на керамическом носителе (НИТУ «МИСиС», Москва), в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий на примере штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Escherichia coli* K-261.

В работе использованы 6 типов керамических пластин с иммобилизованными наноповоротностями: «1441» (TiCaPCON), «1442» (TiCaPCON-Ag), «1446» (TiCaPCON-Zn), «1443» (TiCaPCON-Pt), «1444» (TiCaPCON-Pt-Zn), «1445» (TiCaPCON-Ag-Zn). Тест-штамм *S. aureus* ATCC 25923 получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk», клинический уropатогенный штамм *E. coli* K-261 выделен из мочи пациента Первого Московского ГМУ им. И.М. Сеченова в 2005 г. Суспензии бактерий в физиологическом растворе инкубировали совместно с тестируемыми образцами пластин, для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий делали высевы на питательную среду Mueller-Hinton Agar (HiMedia, Индия). Антибактериальную активность определяли по снижению показателя КОЕ относительно контрольного образца (без пластин) через 3 и 24 ч.

В контрольных образцах зафиксировано увеличение числа КОЕ штаммов *S. aureus* и *E. coli* на один порядок через 3 ч и снижение этого показателя на один порядок от первоначального уровня через 24 ч. В образцах со всеми тестируемыми пластинами с иммобилизованными наночастицами через 3 ч инкубирования не отмечено существенных различий числа КОЕ *S. aureus* и *E. coli* по сравнению с контрольными образцами. Через 24 ч четыре образца («1441», «1442», «1443» и «1444») также не имели отличий в показателях КОЕ штаммов *S. aureus* и *E. coli*. В образцах с наноповоротностями «1445» и «1446» через 24 ч зафиксировано снижение показателя КОЕ для *E. coli*, сравнимое с контролем, а для *S. aureus* – на 1,5 и 3 порядка по сравнению с контролем соответственно.

Таким образом, зафиксировано антибактериальное действие керамических пластин с иммобилизованными наночастицами TiCaPCON-Zn и TiCaPCON-Ag-Zn в отношении грамположительных бактерий штамма *S. aureus* ATCC 25923.

Выделение чистой культуры *Clostridium histolyticum* с использованием метода клонирования

Смирнова Е.С., Слугина О.А.,
Соколова Ю.О., Зайцева Е.С.

ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов», г. Санкт-Петербург

Цель работы. Выделить чистую культуру *Clostridium histolyticum* и оценить продуктивные свойства выделенной культуры в качестве продуцента коллагеназ.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась культура *Clostridium histolyticum*, продуцент комплекса коллагенолитических ферментов. Провели селективный отбор активных колоний гетерогенной культуры *Clostridium histolyticum*, оценку продуктивности выделенных клонов, визуализацию клеток полученной культуры при увеличении в 100 раз. Для оценки продуктивности выделенных колоний проводили культивирование каждой выделенной колонии с последующим исследованием полученных нативных растворов коллагеназ по следующим параметрам: содержание белка, коллагеназная и клострипаиновая активности. Оценку параметров проводили в сравнении с нативным раствором коллагеназ, полученным при культивировании исходной гетерогенной культуры в тех же условиях.

Результаты. Выделены образцы гомогенной культуры *Clostridium histolyticum* с наиболее высокой продуктивностью. Полученные образцы чистой культуры подвергались повторному селективному отбору. В результате проведенного эксперимента удалось выделить образцы гомогенной культуры, продуктивность которых превышает продуктивность гетерогенной культуры на 10–20%. Полученные в результате селективного отбора образцы чистой культуры были подвергнуты криозаморозке. После восстановления культура сохранила жизнеспособность и продуктивные свойства.

Выводы. Установлено, что исходная культура *Clostridium histolyticum* неоднородна и требует селективного отбора наиболее продуктивных клонов. Только часть колоний обладает высокой продуктивной способностью по отношению к гетерогенной культуре. Остальные клоны продуцируют комплекс коллагеназ сходной или меньшей активности, чем ферменты, продуцируемые исходной культурой. Поэтому для повышения производственного выхода коллагенолитических ферментов следует проводить регулярную работу по селекции и выделению активных клеток культуры *Clostridium histolyticum* продуцента коллагеназ.

О внутрилабораторном преаналитическом этапе исследования в бактериологии при использовании высокотехнологичного оборудования

Соловьева И.В., Белова И.В., Точилина А.Г., Иванова Т.П.

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной», г. Нижний Новгород

Результаты бактериологического исследования являются критичным элементом в эпидрасследовании случаев вспышечной и спорадической заболеваемости и должны быть достаточно гармонизированы для уверенности в том, что эпидемиологу обеспечивается правильная расшифровка этиологического фактора с целью разработки рациональных эпидмероприятий в очаге инфекции для его ликвидации. Лабораторное исследование можно разделить на соответствующие этапы, а именно: преаналитический этап, включающий в себя две составляющие – внелабораторную и внутрилабораторную, собственно аналитический этап и

постаналитический этап – получение результата и его интерпретация. Уже неоднократно отмечалось, что на результат расшифровки влияет качество преаналитического этапа исследования, в частности внелабораторная составляющая – правильность забора проб и время доставки в лабораторию. Однако в настоящее время в связи с широким использованием хромогенных питательных сред и высокотехнологичного наукоемкого оборудования стала обозначаться другая проблема: качество проведения внутрилабораторного преаналитического этапа исследования. К настоящему времени доказано, что даже одна изолированная колония может представлять симбиоз, включающий в себя два, а иногда и три микроорганизма разных видов или даже разных родов. Несмотря на то что современные баканализаторы, масс-спектрометры и прочее высокотехнологичное оборудование позволяют идентифицировать смешанные культуры микроорганизмов, все же методики их использования предполагают работу с чистыми культурами. Правильное выделение чистой культуры (применение при расщепе техники истощения по методу Дригальского, использование для культивирования микроорганизмов селективных питательных сред вместо сред для выделения широкого спектра микроорганизмов, ограничение числа пересевов на неселективных питательных средах) уже позволяет в более короткие сроки выделить предполагаемые в качестве этиологического фактора микроорганизмы и избежать потери более прихотливых бактерий при пересевах, а в конечном итоге позволяет значительно сократить время расследования и повысить раскрываемость вспышек инфекционных заболеваний бактериальной природы. И наоборот, некорректная работа с культурами микроорганизмов негативно отражается на всех этапах лабораторного исследования, включая постаналитический, несмотря на высокую квалификацию специалистов, работающих на высокотехнологичном оборудовании, и минимизирует эффективность использования данного оборудования в эпиднадзоре.

***Carpocytophaga* в микрофлоре женских половых путей**

Соловьева Т.Л., Ложкина А.Н.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», г. Чита

Бактерии рода *Carpocytophaga* (<http://www.bacterio.net/carpocytophaga.html>; Zangenah S. и соавт., 2013 /https://www.nature.com/articles/srep22919?WT.feed_name=subjects_pathogens/) являются представителями нормофлоры полости рта (особенно собак и кошек; бактерии выявляются у 85% особей данных животных; 4% от состава микрофлоры полости рта /<http://www.antimicrobe.org/b92.asp/>). При проглатывании ротовой жидкости бактерии попадают в желудок и кишечник.

При вагинозе и вагините представители микрофлоры кишечника могут не только присутствовать в женских половых путях, но и участвовать в развитии патологических процессов. Бактерии *Carpocytophaga* вызывают (особенно у лиц с иммуносупрессией) гингивит, поражения периодонта,

костно-мышечного аппарата, легких, сердца, мозга, перитонит, патологию беременных, плода, неонатальные инфекции (Айламазян Э.К. и соавт., 2016, <https://en.wikipedia.org/wiki/Carpocytophaga>).

При обследовании микробиоты женских половых путей в баклаборатории города колонии капноцитофагов на кровяном агаре высевались у 2% обследованных ($n = 100$). Данные факультативно анаэробные бактерии росли прозрачными колониями, сливающимися со временем (на 2–3-и сутки) в «кружевной платок», хотя по данным литературы характеристика колоний разных видов бактерий несколько различается. Бактерии оксидазанегативные, каталазанегативные, веретенообразной формы с заостренными концами без капсулы (см. <http://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-negative-rods/facultative-anaerobic-3/no-growth-on-mcconkey-agar-without-salt-1/catalase-negative-3/oxidase-negative-5/carpocytophaga-sputigena.html>). Гемолитическая активность отсутствовала, однако вид бактерий *C. haemolytica* вызывает гемолиз эритроцитов на кровяном агаре.

Микробиологический мониторинг возбудителей внутрибольничных инфекций в детской клинической больнице

Соломащенко Н.И., Константинова Н.К., Кудрявцева Ю.В., Сексембаева Е.И., Мазикина И.А.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае», г. Ставрополь

В последнее десятилетие произошло существенное изменение этиологической структуры возбудителей инфекционных процессов: значительно увеличился удельный вес заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, возросла роль неспорообразующих анаэробов и некоторых других видов микроорганизмов, роль которых в инфекционной патологии ранее была неизвестна.

Цель исследования: оценить этиологическую структуру возбудителей внутрибольничных инфекций в детской клинической больнице за 8 месяцев 2016–2017 гг. для повышения качества, достоверности, эффективности диагностических исследований и усовершенствования методов отбора, доставки, выделения и идентификации в лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае».

Материалы для исследования: кровь, пунктаты, биоптаты ран, моча, мокрота, ликвор, отделяемое конъюнктивы глаз, отделяемое ушей от детей из различных отделений больницы.

Методы: выделение возбудителей проводили на коммерческих питательных средах производства «Микроген, НИЦФ, ГНЦ ПМБ (Оболонск), Мерск. Идентификацию изолятов осуществляли с использованием коммерческих тест-систем ММТЕ 1 и ММТЕ 2 для семейства *Enterobacteriaceae*, Стафитест-24 для стафилококков, НЕФЕРМ-тест 24 для ферментирующих грамотрицательных бактерий, Candida-тест для дрожжевых грибов. Определение чувствительности изолятов к антибиотикам проводили диско-диффузионным методом с помощью стандартных дисков производства НИЦФ на среде Мюллера-Хинтона.

Результаты. Всего из 1897 проб клинического материала выделена 1291 культура аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, представленных 14 видами: *Klebsiella spp.* – 19%, *S. aureus* – 13%, *E. coli* – 11%, *E. faecalis* – 11%, *S. epidermidis* – 10%, *P. aeruginosa* – 9,6%, *E. faecium* – 9%, *Proteus spp.* – 3,5%, *Enterobacter spp.* – 3%, грибы – 9%.

Основными возбудителями инфекционных осложнений в ЛПУ являются представители рода *Klebsiella spp.* Из 225 выделенных культур *Klebsiella pneumoniae* 155 культур оказались чувствительны к двум карбапенемам (имипенему и амикацину) или только к имипенему. Остальные 70 изолятов *K. pneumoniae* были устойчивы ко всем исследованным антибиотикам.

Аналогичная ситуация наблюдалась с *P. aeruginosa*: из 124 выделенных культур 45 устойчивы к антибиотикам. Половина (7 из 14) выделенных патогенных стафилококков оказались антибиотикорезистентными.

Изоляты *E. coli* и *Proteus spp.* обладали чувствительностью к большинству антибиотиков. Все возбудители чувствительны к имипенему, почти 80% – к цефалоспорином III поколения. Выявлена высокая активность в отношении кишечной палочки у амикацина и цiproфлоксацина.

В отношении изолятов *Enterobacter spp.* хорошей активностью обладали имипенем, к которому не было выявлено резистентных изолятов, амикацин и цiproфлоксацин. К аминопенициллинам и цефуросиму были резистентны 2% энтеробактеров.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о нарастании доли условно-патогенных микроорганизмов в структуре возбудителей внутрибольничных инфекций и о возрастании числа антибиотикоустойчивых изолятов, что должно быть использовано при разработке рациональных алгоритмов лечения в ЛПУ.

Влияние персистенции вируса Эпштейна-Барр в слизистой оболочке желудка на эффективность антихеликобактерной терапии Нр-ассоциированного хронического гастрита у детей

Спивак Е.М.¹, Левит Р.М.¹, Кузьмина Г.В.², Карпов Н.Л.², Барановская Т.Н.², Деменчук М.Ю.², Саляхутдинова Н.В.²

¹ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», г. Ярославль;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской области», г. Ярославль

Цель работы: установить влияние персистенции вируса Эпштейна-Барр в слизистой оболочке желудка на эффективность антихеликобактерной терапии у детей с хроническим Нр-ассоциированным гастритом.

Пациенты и методы. Наблюдали 49 детей в возрасте 8–16 лет с хроническим гастритом. У всех пациентов с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) установлен факт ко-инфицирования слизистой оболочки желудка (СОЖ) *Helicobacter pylori* (Нр) и вирусом Эпштейна-

Барр (ВЭБ). Типирование Нр, проведенное с помощью ПЦР, позволило во всех случаях установить наличие в геноме инфекта факторов патогенности: CagA, VacA, IceA, BabA.

Результаты. Курс четырехкомпонентной антихеликобактерной терапии (АХБТ) привел к положительному клиническому эффекту, что выражалось в исчезновении абдоминальных болей, уменьшении частоты и выраженности диспептических, интоксикационных и астеновегетативных проявлений заболевания. Результаты повторного морфологического исследования гастробиоптатов, проведенного через 6 месяцев после окончания АХБТ, выявили снижение выраженности воспаления лишь на одну ступень у 42 детей (85,7%), у остальных детей (14,3%) оно сохранялось на прежнем уровне или даже усиливалось. При этом во всех случаях в СОЖ определялось наличие Нр, что указывает на отсутствие эрадикации. Через год после АХБТ дальнейший регресс воспалительного процесса зарегистрирован менее чем у половины больных (46,9%). Полного исчезновения воспалительной инфильтрации с восстановлением нормальной эндоскопической и морфологической картины СОЖ не зарегистрировано. У 48 детей из 49 (98%) в гастробиоптатах по-прежнему определялся Нр, то есть эрадикация произошла только у одного пациента.

Заключение. Коинфицирование слизистой оболочки желудка высокопатогенными штаммами *Helicobacter pylori* и вирусом Эпштейна-Барр приводит к неэффективности антихеликобактерной терапии при хроническом Нр-ассоциированном хроническом гастрите у детей. Указанных пациентов следует рассматривать в качестве группы риска по отсутствию эрадикации Нр.

Микрофлора дыхательных путей при обследовании поликлинических больных г. Воронежа

Стёпкин Ю.И., Холодова Л.А., Дегтярева И.М.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Воронежской области», г. Воронеж

Характерная особенность системы органов дыхания – присутствие разнообразных бактерий (в том числе патогенных) в верхних отделах и относительная стерильность зон газообмена. Именно инфекции дыхательных путей доминируют среди всей инфекционной патологии. В практике бактериологической лаборатории основные образцы для подобных исследований – мазки из носа, носоглотки, зева, мокрота и промывные воды бронхов. Нормальная микрофлора зева, трахеи, бронхов и носа представлена следующими микроорганизмами: *S. epidermidis*, *S. viridans*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Lactobacterium*, *Candida* и др. Возбудителями гнойно-воспалительных процессов дыхательных путей чаще всего являются: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella*, *Candida* и др.

Цель и задачи исследования: определить состав микрофлоры дыхательных путей пациентов поликлиник г. Воронежа и области, выявить процентное соотношение наиболее

часто встречающихся микроорганизмов в разных отделах системы органов дыхания.

Материалы и методы: для бактериологического исследования использовались мазки из носа, носоглотки, зева, мокрота и промывные воды бронхов.

Результаты. В бактериологической лаборатории ФБУЗ проанализированы результаты исследований материала из верхних и нижних дыхательных путей за период 2014–2016 гг. Мазки из зева и носа на микрофлору, мокрота, а также мазки из ротовой полости на грибы поступали от детей и взрослых из поликлиник города и области. Наиболее частые диагнозы – фарингит, тонзиллит, ринит, синусит, хроническая обструктивная болезнь легких, внебольничная пневмония, кандидоз.

За три года исследовано: мазков из носа – 8219 проб, мазков из зева – 10 321 проба, мокроты – 1083 пробы, мазков на грибы из ротовой полости – 515 проб. При исследовании проб из носа в период 2014–2016 гг. были выделены: *S. aureus* – у 28,9% обследуемых; *S. haemolyticus* – у 1,2%; *S. pyogenes* – у 0,5%; *S. pneumoniae* – у 2,8%; *Klebsiella sp.* – у 0,7%; прочие энтеробактерии – у 1,2%; *Candida* – у 0,1%; *H. influenzae* – у 0,6%; *P. aeruginosa* – у 0,2%; неферментирующие микроорганизмы – у 0,2%. Условно-патогенная микрофлора носа представлена преимущественно золотистым стафилококком. Второй по частоте встречаемости – *Streptococcus pneumoniae*. На третьем месте – представители энтеробактерий.

При исследовании материала из зева в период 2014–2016 гг. были выделены следующие условно-патогенные микроорганизмы: *S. aureus* – у 38,1% обследуемых; *S. haemolyticus* – у 20,9%; *S. pyogenes* – у 5,8%; *S. pneumoniae* – у 0,6%; *Klebsiella sp.* – у 2,8%; прочие энтеробактерии – у 2,7%; *Candida* – у 2,1%; *H. influenzae* – у 0,7%; *P. aeruginosa* – у 1,1%; неферментирующие микроорганизмы – у 0,2%. Наиболее частым возбудителем гнойно-воспалительных заболеваний зева является *S. aureus*. Второе место по частоте высеваемости занимает стрептококковая микрофлора, в основном это бета-гемолитические стрептококки. На третьем месте – представители энтеробактерий.

Условно-патогенная микрофлора при исследовании мокроты: *S. aureus* – у 12,5% обследуемых; *S. haemolyticus* – у 11,7%; *S. pyogenes* – у 4,8%; *S. pneumoniae* – у 1,2%; *Klebsiella sp.* – у 5,2%; прочие энтеробактерии – у 6,0%; *Candida* – у 39,8%; *P. aeruginosa* – у 2,1%; неферментирующие микроорганизмы – у 1,3%. Почти половину всей выделенной из мокроты микрофлоры составляют грибы рода *Candida*. На втором месте – стрептококки, далее – золотистый стафилококк, а также представители семейства энтеробактерий, в том числе клебсиеллы.

Из полученных данных следует, что золотистый стафилококк чаще выделяется из зева (у 38,1% обследуемых), чем из носа (у 28,9%). Пиогенный стрептококк почти в равном количестве присутствует в зеве и в мокроте (у 5,8% и у 4,8% обследуемых соответственно). Пневмококки преимущественно выделяются из носа (2,8% обследуемых), затем из мокроты (у 1,2%), и менее всего из зева (у 0,6%); клебсиеллы в два раза чаще встречались в мокроте (у 5,2%), чем в зеве (2,8%). За три года количество *H. influenzae*, выделенной из зева и носа, увеличилось в два раза (2014 г. – 25,

2015 г. – 43, 2016 г. – 64 культуры). Полученные данные позволяют проследить, как меняется соотношение разных видов грибов рода *Candida* в течение трех лет. Несмотря на то что подавляющее большинство выделенных из дыхательных путей *Candida* – *C. albicans*, их количество постепенно уменьшается (88,3%, 87,5%, 86,2% в 2014, 2015 и 2016 гг. соответственно). Процент *C. glabrata*, напротив, увеличивается (6,3%, 6,9%, 10,5% соответственно в 2014, 2015 и 2016 гг.).

Выводы.

- Основными возбудителями гнойно-воспалительных процессов органов дыхания являются *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *Klebsiella*, *P. aeruginosa*, *Candida* и др.
- Пневмококки наиболее часто обнаруживаются в носу, чем в зеве и мокроте.
- Пиогенный стрептококк в равном количестве присутствует в зеве и мокроте.
- Клебсиеллы в два раза чаще выделяются из мокроты, чем из зева и носа.
- За три года количество гемофильной палочки, выделенной из дыхательных путей, выросло в два раза.
- В течение трех лет намечается тенденция к уменьшению доли *C. albicans* при исследовании органов дыхания на кандидоз и увеличение доли *C. glabrata*.

Клинически значимые штаммы отделения пульмонологии Краевой клинической больницы №1 в 2012–2016 гг., взаимовлияние с микрофлорой корня языка

Стрельникова Н.В.^{1,3}, Туркутюков В.Б.², Кольцов И.П.¹, Зайцева Е.А.², Коменкова Т.С.², Чупахина Я.Э.¹, Алексеева И.Н.³, Ольферук Е.А.¹, Батыргареева А.В.¹, Паус И.С.¹, Кутепова А.К.¹

¹ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет», г. Хабаровск;

²ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», г. Владивосток;

³КГБУЗ «Краевая клиническая больница №1 им. проф.С.И. Сергеева», г. Хабаровск

По данным ВОЗ, инфекции нижних дыхательных путей (НДП) остаются самой смертоносной инфекционной болезнью и относятся к числу 10 ведущих причин смерти людей. Взаимовлияние мокроты при инфекциях НДП и биотопов корня языка мало изучено.

Цель исследования. Выявить клинически значимые штаммы в отделении пульмонологии, их чувствительность к антибиотикам и определить взаимовлияние с условно-патогенной микрофлорой корня языка.

Материалы и методы. Мокрота, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), соскоб с корня языка при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), бронхиальной астме (БА), внебольничных пневмониях (ВП); проведены микробиологические исследования, согласно действующим нормативным документам.

Результаты. Хронические заболевания в отделении пульмонологии преобладают над острыми: ХОБЛ составляют 44%,

БА – 8%, ВП – 33%, плеврит – 7%, бронхоэктатическая болезнь – 5%, абсцесс легкого – 4% и прочие 38 нозологий – 5%. В 2012 г. исследовано 222 пробы: мокроты – 67%, БАЛ – 30%, другие материалы – 3%. В пробах наиболее часто выявляли *S. viridans* – 27%, *E. faecalis* – 19%, *C. albicans* – 18%, *S. pyogenes* – 9%, *Staphylococcus spp.* – 14 %, *E. faecium* – 5%, *S. pneumoniae* – 3%, бактерии группы кишечной палочки (БГКП) – 5 %. В 2013 г. проанализировано 390 проб: мокроты – 52%, БАЛ – 46%. Среди выделенных культур: *E. faecalis* – 40%, *C. albicans* – 20%, *S. viridans* – 14%, *S. pneumoniae* – 9%, В 2014 г. исследовано 443 пробы (мокроты – 34%, БАЛ – 65%) и выделено *E. faecalis* – 41%, *S. pneumoniae* – 11%, БГКП – 5%. Соскобов корня языка исследовано 27 проб. Совпадение по виду, титру условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) языка и мокроты составило $93,3 \pm 0,09\%$.

В 2015 г. проанализировано 459 проб, из них мокроты – 34%, БАЛ – 66%. Из исследованных проб выделены культуры *E. faecalis* – 27%, *S. viridians* – 14%, *C. albicans* – 10%, *S. pneumoniae* – 6%, *S. epidermidis* – 3%, *S. aureus* – 3%, *S. pyogenes* – 2%, *P. aeruginosa* – 2%. За тот же период исследовано 35 соскобов корня языка. Совпадение по виду, титру условно-патогенных микроорганизмов языка и мокроты составило $91,8 \pm 0,17\%$. В 2016 г. исследовано 565 проб мокроты и БАЛ, а также 36 соскобов корня языка. Совпадение по виду, титру условно-патогенных микроорганизмов языка и мокроты – $92,6 \pm 0,07\%$.

При ХОБЛ выявление *E. faecalis* и *S. viridans* из мокроты и БАЛ статистически достоверно схожи. При ВП из БАЛ чаще, чем из мокроты, выявляется культуры *S. pneumoniae*. Пневмококк чаще выявляется из БАЛ, независимо от нозологии. При БА чаще выделяются *E. faecalis*, *S. viridians*, *S. pneumoniae*. Лидирующий условно-патогенный микроорганизм при хронических процессах дыхательных путей – *E. faecalis*, его роль возрастает от 19% в 2012 г. до 41% в 2014 г., и составляет 27 % в 2015 и 2016 гг. Пневмококки с корня языка не выделяются.

Чувствительность к антибиотикам вариабельна, среди возбудителей встречаются штаммы MRSA; MRSE; мультирезистентные штаммы *E. faecalis*, *E. cloacae*, *S. aureus*, устойчивые как минимум к 3 антибиотикам; *E. faecium*, устойчивые как минимум к 5 антибиотикам; появляются полирезистентные штаммы *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, устойчивые ко всем исследуемым классам антибиотиков. В течение последних 5 лет антибиотикорезистентность к разным группам препаратов возросла до 35%.

Выводы. Совпадение условно-патогенной микробиоты корня языка и мокроты существенно и превышает 90%. Пневмококки с корня языка не выделяются.

Выявлены некоторые особенности сезонности выделения этиологических агентов. Так, для *S. pneumoniae* типична зимняя и весенняя сезонность, для *E. faecalis* и *C. albicans* сезонность не характерна: высокие показатели регистрируются в течение всего года. Возможно, это проявление дисбактериоза дыхательных путей.

Взаимовлияние биотопов корня языка и мокроты мало изучено, важно детализировать исследование с целью применения полученных данных для прогнозирования заболеваний дыхательных путей.

Микрофлора фильтров бытовых кондиционеров и поиск путей ее снижения

Суворова Д.А., Кузнецов О.Ю.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», г. Иваново

В последнее время существенно увеличилось количество бытовых кондиционеров в наших домах, и они уже перестали быть роскошью. Однако одновременно с этим появляется незаметная, но таящая в себе серьезный риск проблема – микроорганизмы, которые успешно осваивают фильтры данных кондиционеров. Более того, микроорганизмы, попавшие на фильтр, способны там активно размножаться и стать вполне реальной угрозой здоровью и даже жизни человека. На самом фильтре и внутри его могут накапливаться микроорганизмы, которые способны вызывать эпидемические вспышки у людей, которые находились в помещении, где работали кондиционеры с такими фильтрами.

Нами были выполнены эксперименты по оценке микробной обсемененности фильтров бытовых кондиционеров в процессе их использования. Оценивалось общее микробное число (ОМЧ), отражающее состояние всей микробиоты на фильтре и отдельно наличие стафилококка, выбранного нами в качестве основного потенциально опасного микроорганизма. Стафилококк к тому же является постоянным представителем нормальной микрофлоры тела человека, и его накопление или отсутствие на фильтре, на наш взгляд, может служить тестом пригодности фильтра к дальнейшей эксплуатации. В ходе работы использовали плотные агаризованные питательные среды – мясопептонный и желточно-солевой агар. Высевы на эти питательные среды выполняли следующим образом. На чашку Петри с соответствующей питательной средой направляли перпендикулярно плотной среде в чашке воздушный поток из кондиционера на стандартном расстоянии для данного эксперимента в 20 см. Обнаружено, что фильтр, который длительно работал в кондиционере, обильно обсеменен микроорганизмами, которые массивно выходят из фильтра в момент включения кондиционера. В поиске возможности снижения числа микроорганизмов в воздушном потоке, исходящем с поверхности фильтра, нами были успешно использованы созданные нами препараты композиции эфирных масел как отдельно, так и с добавлением стафилококкового бактериофага. Так, например, использование препаратов со стафилококковым бактериофагом и эфирными маслами снижает ОМЧ до нуля на длительное время при отсутствии повторной контаминации микрофлорой фильтра кондиционера.

Микробиота кишечника как резервуар резистентных к антибиотикам штаммов энтеробактерий

Сужаева Л.В., Макарова М.А.

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

Устойчивость к антимикробным препаратам (АМП) носит глобальный характер. Высокий уровень резистентности в популяциях возбудителей инфекционных заболеваний свидетельствует о том, что арсенал препаратов для терапии стремительно истощается. *E. coli* являются облигатными обитателями кишечника млекопитающих и могут служить постоянным резервуаром детерминант резистентности, расположенных в составе мобильных генетических элементов. В этих условиях попадающий в макроорганизм любой патогенный возбудитель, изначально чувствительный к АМП, может приобрести гены резистентности, что приведет к формированию устойчивого к АМП патогена. Это значительно осложняет проведение адекватной антимикробной терапии, а также способствует дальнейшему быстрому распространению генов резистентности в популяции возбудителя. При изучении чувствительности к АМП более 300 штаммов *E. coli*, выделенных из кишечника здоровых лиц, устойчивым к одному или нескольким АМП оказался практически каждый второй штамм (47,2%). Отмечена резистентность к АМП различных групп: бета-лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, нитрофуранам, ко-тримоксазолу и хлорамфениколу. Частота выявления устойчивых штаммов варьировала от 0,9% (нитрофураны) до 38,6% (ампициллин). Все штаммы оставались чувствительными к карбапенемам (меропенему) и фосфомицину. Резистентность к цефалоспорином расширенного спектра выявлена у 9,7% штаммов, и была обусловлена продукцией бета-лактамаз расширенного спектра, преимущественно СТХ-М класса. Нередко резистентность к бета-лактамам сочеталась с резистентностью к аминогликозидам и фторхинолонам, что характерно для «госпитальных» штаммов *E. coli*. Устойчивость к фторхинолонам низкого уровня (резистентность к налидиксовой кислоте) составляла 11,9%, высокого уровня (ципрофлоксацин) – 2,3%. Содержание устойчивых к АМП штаммов *E. coli* в 1,0 г фекалий было значительное и превышало 10^5 КОЕ, что исключает случайные находки таких штаммов.

Таким образом, у значительной части штаммов *E. coli*, входящих в состав нормальной микробиоты кишечника практически здоровых детей, была выявлена устойчивость к АМП, используемым при терапии инфекций различной локализации. Наличие резистентных штаммов *E. coli* в составе нормальной микробиоты кишечника человека является нежелательным, но практически неизбежным следствием широкого и нерационального использования АМП в медицине, ветеринарии, пищевой индустрии, сельском хозяйстве.

Изучение антимикробной активности экстрактов кустистых лишайников Центральной Якутии

Тарасова Л.А.¹, Прокопьев И.А.², Филиппова Г.В.², Шейн А.А.², Ахременко Я.А.¹

¹ФГАУ ВПО «Северо-Восточный Федеральный университет им. М.К. Аммосова», г. Якутск;

²Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук, г. Якутск

Широкое распространение антимикробной резистентности обуславливает актуальность поиска новых нестандартных источников антибиотиков. Перспективным направлением является изучение природного сырья как потенциального ресурса противомикробных лекарственных веществ. В настоящее время известно порядка 500 соединений, относящихся к группе лишайниковых кислот, многие из которых обладают антимикробными свойствами.

Целью настоящего исследования явилось изучение антимикробной активности этанольных экстрактов эпигейных и эпифитных видов кустистых лишайников (семейства *Cladoniaceae*, *Parmeliaceae*), произрастающих в условиях Центральной Якутии, в отношении эталонных штаммов микроорганизмов.

Определение антимикробной активности этанольных экстрактов эпигейных и эпифитных кустистых лишайников семейств *Cladoniaceae* и *Parmeliaceae* проводили методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде мясо-пептонный бульон в 2–32 раз.

В качестве тест-культур использовали контрольные штаммы американской коллекции типовых культур: *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213. Тестирование проводили в 2 мл каждого разведения экстрактов с конечной концентрацией тест-культур 5×10^5 КОЕ/мл. В качестве «отрицательного» контроля использовали вариант с питательной средой и соответствующей тест-культурой, не содержащей экстракт лишайника. Параллельно определялась активность 96% этилового спирта в отношении тех же тест-культур с использованием аналогичной методики.

Бактерицидный эффект всех экстрактов в отношении грамположительных бактерий достигался при использовании в более низких концентрациях (МПК 0,1–0,5 мг/мл). В отношении грамотрицательных бактерий антимикробный эффект примененных экстрактов был менее выражен и проявлялся в концентрациях более высоких, чем для грамположительных (МПК 0,3–1,0 мг/мл). Это дает основания предположить, что экстракты лишайников содержат природные антимикробные вещества, обладающие избирательной активностью в отношении эталонных микроорганизмов.

Выделение, очистка и характеристика свойств энтероцина E28, продуцируемого штаммом *Enterococcus mundtii* 28

Теймуразов М.Г., Абаимова А.А., Борзенков В.Н., Перельгин В.В., Похиленко В.Д., Тазина О.И., Детушев К.В., Фурсова Н.К., Светоч Э.А.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

Одной из альтернатив антибиотикам в борьбе с резистентными бактериальными патогенами являются рибосомально синтезируемые микроорганизмами низкомолекулярные пептиды – бактериоцины. Значительную часть среди известных бактериоцинов занимают энтероцины, синтезируемые энтерококками.

Цель данной работы – оптимизировать схему выделения и очистки энтероцина E28, продуцируемого штаммом *Enterococcus mundtii* 28, выделенного в 2008 г. из молочных продуктов, и охарактеризовать его антимикробную активность.

Разработана двухэтапная схема выделения и очистки бактериоцина E28: 1) культивирование штамма-продуцента в MRS-бульоне при 35°C, при аэрации (110 об/мин) в течение 14 ч, в присутствии сорбента CM-Sephadex C25 (Sigma-Aldrich, США); 2) очистка бактериоцина путем отмывки сорбента буфером А (0,05 М CH₃COONa, 10%/об. C₂H₅OH, pH 5,0) с последующей ионнообменной хроматографией. Элюцию бактериоцина проводили в градиенте 0→100% буфера В (0,2 М PBS, 0,5 М NaCl, 10%/об. глицерин, 20%/об. C₂H₅OH), со скоростью 5 мл/мин. Культуральную жидкость (КЖ) контрольных образцов (без сорбента) центрифугировали и наносили на хроматографическую колонку ХК-16 (General Electric, США) с сорбентом CM-Sephadex C25, промывку и элюцию проводили по той же схеме. Детекцию пиков бактериоцина осуществляли с помощью хроматографа АКТАprime (General Electric, США) при длине волны 289 нм. Использование данного метода выделения и очистки бактериоцина E28 позволило увеличить его выход на 10%.

Степень очистки, молекулярную массу и выход бактериоцина определяли электрофоретически в полиакриламидном геле, масс-спектрометрически на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия) и методом обращенно-фазовой хроматографии ВЭЖХ на колонке С18 (Mediterranea 25 × 0,46) на хроматографе АКТАpurifier 10. Выход бактериоцина составил 68%, молекулярная масса – 4,3 кДа. Препарат был устойчив к трипсину, химо tripsину, инактивировался протеиназой К, не терял активности после автоклавирования в режиме 0,5 атм., 15 мин. Бактериоцин E28 подавлял рост 100% использованных тест-штаммов *Listeria spp.* ($n = 78$) и *Enterococcus spp.* ($n = 112$).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что разработана высокоэффективная схема выделения и очистки нового бактериоцина – энтероцина E28 из штамма *E. mundtii* 28. Энтероцин E28 может рассматриваться в качестве потенциального антибактериального препарата для использования в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности.

Особенности формирования биопленки штаммами чумного микроба с плазмидой рTP33 в организме блохи *Xenopsylla cheopis*

Токмакова Е.Г., Базанова Л.П., Воронова Г.А., Балахонов С.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск

Изучение роли плазмид в персистенции *Yersinia pestis* продолжает быть актуальным. Особенность штаммов, циркулирующих на территории Тувинского природного очага, заключается в наличии «дополнительной» плазмиды рTP 33 с молекулярной массой ~22 МД. Полная нуклеотидная последовательность четвертой маркерной плазмиды определена, но ее функциональная роль только предполагается.

Цель работы – изучение в эксперименте и анализ влияния плазмидного состава *Y. pestis* на формирование биопленки в организме блох-переносчиков. В исследование взяты три штамма *Y. pestis*: вирулентный трехплазмидный штамм И-3230, изолированный в Монголии (Хэнтейский аймак, Омнодэлгэр сомон), и референтный для Тувинского природного очага чумы штамм И-2638, имеющий четыре плазмиды (рYT, рYV, рYP, рTP 33), а также селекционированный от него авирулентный изогенный клон И-3480, утративший две плазмиды (рYV, рYP). В качестве объекта инфицирования выбрана крысиная блоха *Xenopsylla cheopis* – широко распространенный и высокоактивный переносчик чумного микроба. Особенности формирования биопленки анализировали по доле блох с небольшими свободноплавающими образованиями (бактериальными «глыбками»), массивными прикрепленными (полными и частичными) блоками, а также всеми визуально определяемыми формами в сумме за каждую подкормку. Влияние фактора «штамм» на изучаемые показатели оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

Влияние фактора «штамм» не установлено для образования всех форм биопленки ($F = 0,80$; $P > 0,05$) и «глыбок» ($F = 1,64$; $P > 0,05$), но оказалось достоверным для полных и частичных блоков ($F = 11,67$; $P < 0,001$). Но и «глыбки» в среднем за подкормку формировались вдвое чаще у блох, инфицированных трехплазмидным штаммом И-3230 ($8,9 \pm 4,18\%$), чем у зараженных И-2638 ($3,1 \pm 0,73\%$) и И-3480 ($3,8 \pm 0,66\%$). Таким образом, по формированию чумным микробом массивных форм биопленки в организме *X. cheopis* штаммы, содержащие плазмиду рTP33 (И-2638 и И-3480), существенно превосходили трехплазмидный штамм И-3230, что, несомненно, имеет значение для выживания и распространения возбудителя чумы.

Подготовка специалистов медико-профилактического профиля по вопросам биологической безопасности – важный этап подготовки практических врачей

Тюрин Е.А., Коломбет Л.В.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

Биологическая безопасность – научно-практическая дисциплина, опирающаяся на новейшие достижения микробиологии, вирусологии, медицины инфекционных болезней, эпидемиологии, молекулярной биологии и генетики, биологической технологии и инженерии. Фундаментальные основы упомянутых наук значительно расширились, и это открыло новые возможности их применения в здравоохранении. Одновременно интенсивное развитие биотехнологии, геномной инженерии, методов клонирования существенно изменило методологию изучения «новых» и «возвращающихся» инфекционных заболеваний. В настоящее время накоплены обширные научно-практические знания в области обеспечения биологической безопасности, которые положены в основу просветительской и образовательной деятельности в разных странах. Разработаны и внедрены в практику многие положения, правила и инструкции, регламентирующие работу с микроорганизмами. Между тем, как показывает практика, специалисты-практики медико-биологического профиля слабо представляют себе основные положения и требования биологической безопасности. Опыт преподавания курса биологической безопасности в различных организациях свидетельствует о том, что специалисты, работающие в практическом здравоохранении, не представляют себе важности этой проблемы, тем более что в нынешних условиях санкций и политической напряженности обеспечение биологической безопасности РФ приобретает особую актуальность. К сожалению, в программе высшей школы такой курс отсутствует, а в рамках курса подготовки специалистов микробиологов или эпидемиологов наличие такого предмета было бы весьма логичным. Также отсутствует доступная и современная учебная литература по вопросам биологической безопасности. Очевидно, что в учебные программы подготовки специалистов медико-профилактического профиля необходимо включить разделы по биологической безопасности.

Опыт применения полумаски/респиратора «ШБ-1» в качестве СИЗ органов дыхания при работе с ПБА

Тюрин Е.А., Чекан Л.В.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

Полумаски фильтрующие «ШБ-1/Лепесток-200» (класс защиты FFP3) применяются в качестве средств защиты органов дыхания для работы с микроорганизмами I–IV групп патогенности (опасности) на основании положений санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы

с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» (СП 1.3.3118-13) и «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» (СП 1.3.2322-08). Респиратор является основным, а в некоторых случаях единственным средством защиты органов дыхания сотрудников, работающих с микроорганизмами. Для бюджетных организаций, в которых закупки проводятся по конкурсу, необходимо правильно составлять техническое задание на данное изделие. Однако в последнее время мы столкнулись с тем, что для реализации поставляются изделия, не соответствующие заявленным характеристикам и стандартам. Несмотря на то, что закупаемые респираторы внешне похожи один на другой, можно отметить, что они сделаны грубо, торчат нитки, отсутствует наружный слой марли, на который крепится фильтр-ткань, и количество ее слоев разное (2–3). Пластиковая распорка бывает как в виде «снежинки», так и в виде «восьмерки», распорка разного цвета (красная, синяя). На лице после их использования остаются ворсинки ткани. Изделия упакованы в полиэтиленовые пакеты по 20 штук и более, тогда как предполагается, что каждый респиратор упаковывается отдельно. Завязки, изготовленные из синтетического материала, а не из хлопчатобумажной тесьмы и зачастую отрываются при надевании, что ведет к перерасходу респираторов. Маркировка или отсутствует совсем или выполнена не на самом изделии, а в каком-то другом месте, например, на завязке и пропечатана она не четко. Уверенности в том, что используется ткань Петрянова (ФПП-15), тоже нет, хотя в сопроводительных документах и на упаковке указана она. Имея достаточно большой опыт работы с подобными изделиями (с 1986 года), только в последнее время стали сталкиваться с такими явлениями и сомневаться в надежности приобретаемых СИЗ.

Этиотропная терапия холеры холерными бактериофагами

Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Селянская Н.А., Егизарян Л.А., Погожова М.П.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт», г. Ростов-на-Дону

Сообщения, свидетельствующие о выделении антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae* в различных регионах мира и снижение эффективности антибиотиков, вызывают необходимость поиска новых антибактериальных средств.

Целью работы было выделение и изучение *in vivo* смеси холерных фагов для этиотропной терапии холеры.

В работу были отобраны холерные фаги, лизирующие вибрионы O1 серогруппы биоваров *Classical* и *El Tor*.

В опытах *in vivo* использовали антибиотикорезистентный штамм *V. cholerae El Tor* 19243 (ctx+, tcp+), выделенный от больного в 2012 г. (г. Москва).

Белых мышей заражали внутрибрюшинно взвесью 18-часовой агаровой культуры (37°C) холерного вибриона в 0,3% агаризованном 0,9% растворе хлорида натрия в дозе 10⁸ м.к. в 0,2 мл.

Смесь фагов вводили перорально в объеме 0,5 мл в концентрации $n \times 10^9 - n \times 10^{10}$ БОЕ/мл, одновременно с заражением с последующим трехдневным введением один раз в сутки. Наблюдение за животными осуществляли в течение 10 дней. Опыт учитывали при 100% гибели контрольных животных.

Нами была проведена *in vitro* оценка бактериофагов холерных вибрионов из коллекции лаборатории бактериофагов с целью подбора наиболее эффективных штаммов фагов. При отборе фагов учитывались следующие показатели: специфичность литического действия в отношении вибрионов, максимально высокая репродуктивная активность, степень лизиса гомологичных бактерий, продолжительность культивирования, скорость размножения, посевные дозы бактерий и фагов.

Наиболее перспективными для лечения холеры оказались холерные фаги, обладающие высокой литической активностью. Спектр литической активности одного из фагов имеет широкий диапазон, включающий холерные вибрионы биоваров *Classical* и *El Tor*. Диапазон литической активности второго фага распространяется только на холерные вибрионы биовара *El Tor*, но в высоком проценте (70%). По данным электронно-микроскопического исследования, эти холерные бактериофаги относились к III морфогруппе (Тихоненко А.С., 1968) и типу семейства *Podoviridae* (Ackerman Н.В., 1987), но к разным серологическим типам холерных фагов.

Результаты показали высокую выживаемость животных (90 ± 14%). Это можно объяснить активацией фагоцитоза, повышением активности нейтрофилов, что препятствует рецидивированию инфекции и хронизации воспалительного процесса.

Таким образом, эксперимент показал высокую эффективность лечебного использования данной фаговой смеси в отношении антибиотикорезистентного штамма *V. cholerae El Tor* 19243 на модели белых мышей.

Актуальность профилактики туляремии в Алтайском крае

Уланова Г.И., Щукина М.А.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае», г. Барнаул

По данным референс-центра по туляремии ФКУЗ НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока, г. Иркутск – Алтайский край определен как территория с высоким риском заболевания туляремией. Циркуляцию и активность туляремийной инфекции в Алтайском крае подтверждают сведения о положительных находках, полученные в ходе серологических и бактериологических исследований на базе лаборатории особо опасных инфекций.

Ежегодно лаборатория особо опасных инфекций исследует 1100 проб объектов внешней среды – грызуны, клещи, вода, погадки и др. За период с 2008 г. была выделена 61 культура туляремийного микроба из клещей, которые относились к видам *Ixodes reticularis* – 39,6%, *Ixodes silvarum* – 22,2%, *H. concina* – 9%, *Ixodes marginatus* – 9,5%, *Ixodes persulcatus* – 6,3%.

В природных очагах туляремии в РФ до 2011 г. выделялись только культуры голарктического подвида возбудителя туляремии *F. tularensis*. Впервые в 2011 г. в трех районах Алтайского края были выделены от клещей двух видов и сибирской красной полевки по одной культуре – штаммы *F. tularensis mediaasiatica Aikimbaev*. Культуры были изучены на базе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (Оболонск). Таким образом, на территории Алтайского края циркулируют два подвида возбудителя туляремии: *F. tularensis holarctica* и *F. tularensis mediaasiatica*.

В Алтайском крае прослеживается тенденция к расширению территорий, где регистрируется активность природных очагов туляремии. Активными природными очагами туляремии являются Солтонский, Бийский, Алтайский, Красногорский и другие районы Алтайского края.

Наряду с исследованием объектов внешней среды, лаборатория особо опасных инфекций ежегодно определяет степень напряженности коллективного иммунитета населения Алтайского края к туляремии, согласно плану государственного задания (1700 проб). Иммуная прослойка в 2014 г. составила – 35,1%, в 2015 г. – 52,7%, в 2016 г. – 55,9%. Ежегодный рост серопозитивности сывороток свидетельствует о росте степени защищенности населения, проживающего в природных очагах Алтайского края.

Своевременная вакцинация населения – результативная мера профилактики против туляремии в эндемичных районах Алтайского края.

Полногеномное секвенирование генома *Mycobacterium heckeshornense*

Устинова В.В.¹, Смирнова Т.Г.¹, Варламов Д.А.², Ларионова Е.Е.¹, Андриевская И.Ю.¹, Черноусова Л.Н.¹

¹ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва;

²ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», г. Москва

Цель исследования – полногеномное секвенирование штамма *M. heckeshornense*. Случаи выделения от больных микобактериозом этого вида редки, однако в 2000–2016 гг. выходили статьи, описывающие случаи поражения *M. heckeshornense* тканей и органов человека. Исследуемая культура *M. heckeshornense* была получена от пациентки противотуберкулезного учреждения. Микроскопия образца легкого с окраской флуоресцентными красителями показала наличие большого числа кислотоустойчивых палочек, которые дали рост на жидкой среде Middlebrook 7H9 в системе Bactec MGIT 960. Видовую принадлежность определяли секвенированием гена 16S rRNA. ДНК для проведения секвенирования была выделена стандартным фенол-хлороформным методом. Библиотеки ДНК готовили с использованием набора NexteraXT (Illumina, США). Парноконцевое секвенирование полученных библиотек ДНК проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina) с использованием набора реагентов MiSeq® Reagent Kit v2, 500 циклов. Анализ качества полученных прочтений провели с помощью ПО FastQC 0.11.3. Последова-

тельности адаптеров, нуклеотиды с качеством ниже q30, N-нуклеотиды, прочтения длиной менее 50 нуклеотидов были удалены из полученных данных с помощью ПО Trimmomatic 0.33. Сборку генома *de novo* проводили с помощью ПО SPAdes 3.9.0, используя опцию “careful” и значения k 21, 33, 55, 77, 99, 127. Оценку качества сборки проводили с помощью ПО Quast. Итоговая сборка генома состоит из 377 контигов (4 705 751 п.н.) со значением N50 = 56,195 п.н. и GC составом 66%. Аннотацию генома выполнили с помощью NCBI Procarotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). Итоговая аннотация содержит 4,625 генов; 4,574 кодирующих последовательностей (CDS); 312 псевдогенов; одна 16S, одна 23S и одна 5S рРНК; 45 тРНК и 3 некодирующих РНК (нкРНК). Геномный проект депонирован в базу данных DDBJ/EMBL/GenBank с номером доступа MPJF00000000. Полученная последовательность генома и анализ ее функциональной аннотации послужат источником новых сведений о филогении *Mycobacterium heckeshornense*, ее патогенности, вирулентности и других биологических характеристиках.

Этиологическая структура и антибиотикочувствительность основных возбудителей инфекционных заболеваний по данным ШГИБ

Утепбергенова Г.А., Кульжанова К.Д.,
Амалова Г.А., Есеналиева Ж.Н.

Шымкентская городская инфекционная больница,
г. Шымкент, Республика Казахстан

Проблемой во всем мире становится рост числа штаммов, устойчивых к противомикробным препаратам. Формированию штаммов с множественной антибактериальной устойчивостью способствуют широкое назначение антибиотиков для лечения многих заболеваний человека как в амбулаторных, так и в стационарных условиях, самолечение, что в значительной мере осложняет эффективную этиотропную терапию. Поэтому на этапе эмпирического выбора для принятия решения о назначении препарата в первую очередь врач должен иметь представление о современном спектре резистентности и чувствительности бактерий к широко используемым лекарственным средствам.

Цель исследования – провести анализ антибиотикочувствительности штаммов из различных биоматериалов в ШГИБ за 2017 г. и определить чувствительность выделенных штаммов к антибактериальным препаратам, применяемым в практическом здравоохранении.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили гемокультура, мазки из зева и носа, мокрота, биоптат легкого, плевральная жидкость, промывные воды, мазок из уха, уринокультура, копрокультура, отделяемое из раны, спинномозговая жидкость. Идентификацию выделенных микроорганизмов и чувствительность выделенных микроорганизмов к 30 антибактериальным препаратам различных групп осуществляли с помощью анализатора MicroScan Walk Away-40.

Результаты. В результате бактериологического обследования было идентифицировано 11 культур. Грамположительные микроорганизмы, как правило, были представлены *S. aureus* (42%) и *St. pneumoniae* (2%). Доля грамотрицательных бактерий составила 55%. В основном это были микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*: *Shigella* (24%), *Salmonella* (9%), *Kl. ozanae* (8%), *Kl. pneumoniae* (4%), *P. aeruginosa* (4%), *Sh. sonnei* (3%), *Y. pseudotuberculosis* (2%), *Y. enterogroup* (1%), *S. choleraesuis* (1%).

Выделенные штаммы *S. aureus* в 100% случаев были чувствительны к норфлоксацину, в 94% – к офлоксацину, линезолиду, пиперациллин-тазабактаму, в 71% – к клиндамицину. 95% штаммов были устойчивы к пенициллину и ампициллину.

Штаммы *Shigella sp.* чувствительны на 98–97% к тазоцину и тигециклину, резистентны в 93% к тетрациклину, 91% к левомицетину, ампициллину.

К амикацину были чувствительны клебсиеллы и иерсинии энтероколита (92 и 100% соответственно). Высокая чувствительность (100%) к цефокситину и цефепиму отмечалась у штаммов *Y. enterogroup*. Штаммы *Y. pseudotuberculosis* оказались высокочувствительными в 100% к таким препаратам, как амоксициллин/клавуналат, цефтриаксону, азтреонаму. И та, и другая группа иерсиний были высокочувствительны в 100% к эртапенему, гентамицину и имипенему. Штаммы *Y. enterogroup* оказались высокорезистентными к таким препаратам, как ампициллин – в 100%, ципрофлоксацин – 67%, тогда как *Y. pseudotuberculosis* были резистентны к цефтазидину (75%).

Выделенные штаммы *Kl. pneumoniae* были устойчивы к цефалотину и чувствительны к эртапенему (100%), цефтриаксону (83%), штаммы *Kl. ozanae* были чувствительны к пиперациллину/тазабактаму (100%) и устойчивы к триметаприму (100%).

Изоляты *P. aeruginosa* обладали высокой чувствительностью к пиперациллину/тазабактаму (100%), меропенему (90%) и были нечувствительны к цефтазидин клавуналату (40%).

Штаммы *Salmonella* оказались чувствительными к тигециклину в 100%, эртапенему в 94% случаях, имипенему, меропенему в 90%, ципрофлоксацину в 86%. Следует отметить и отсутствие чувствительности большинства штаммов сальмонелл к цефуросиму, цефазолину (100%), хлорамфениколу (55%), цефтриаксону 50%.

Изоляты *S. choleraesuis* показали высокую чувствительность (100%) к амоксициллину/клавуналату, цефтазидину, ципрофлоксацину, цефтазидин/клавуналату, эртапенему, имипенему.

Таким образом установлено, что штаммы вышеуказанных бактерий обладают различным спектром антибиотикорезистентности, и они не должны включаться в схему этиотропной терапии до определения антибиотикочувствительности штамма, выделенного от больного.

Анализ масс-спектров штаммов возбудителя чумы *Yersinia pestis* различных подвидов

Уткин Д.В.¹, Спицын А.Н.¹, Щербакова Н.Е.¹, Абдраштова А.С.¹, Куклев В.Е.¹, Осина Н.А.¹, Щербакова С.А.¹, Кутырев В.В.¹, Афанасьев М.В.², Миронова Л.В.³, Остяк А.С.³, Вдовиченко Г.В.³, Токмакова Е.Г.³, Куликалова Е.С.³, Татарников С.А.³, Басов Е.А.³, Балахонов С.В.³

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Саратов;

²ОГАУЗ «Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр», г. Иркутск;

³ФКУЗ «Иркутский орден Трудового Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Иркутск

В последние годы метод MALDI-ToF масс-спектрометрии нашел широкое применение для идентификации штаммов возбудителей особо опасных инфекционных болезней, в том числе, чумного микроба. По результатам ранее проведенных исследований сформирована база белковых масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности (гос. рег. №2016620345), включающая масс-спектры 41 штамма *Y. pestis* основного и четырех неосновных подвидов (кавказского, алтайского, гиссарского и улегейского). Полученная база в сочетании с программным обеспечением позволяет определять принадлежность исследуемых штаммов к виду *Y. pestis*. В то же время в масс-спектрах выявлены отдельные пики, характерные для штаммов основного и кавказского подвидов [Афанасьев М.В., 2014]. Специфичность масс-спектров для других подвидов не определена.

Цель данной работы заключалась в проведении сравнительного анализа масс-спектров штаммов возбудителя чумы пяти подвидов и оценки возможности внутривидовой дифференциации чумного микроба с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии.

В результате компьютерного анализа масс-спектров штаммов *Y. pestis* определены 11 пиков общих для штаммов всех подвидов *Y. pestis* со значениями m/z (± 2 Да): 4185, 4350, 4831, 5429, 6046, 6241, 7190, 7278, 8370, 9268, 9662. Кроме того, у штаммов основного подвида обнаружены специфичные пептиды 3062 Да и 5796 Да, у штаммов кавказского подвида – пептид 3237 Да, описанные ранее [Афанасьев М.В., 2014]. Впервые выявлены фрагменты 6472 Да у штаммов кавказского подвида, 4393 Да и 7237 Да у штаммов гиссарского подвида. У штаммов алтайского и улегейского подвидов указанные и специфичные маркеры в данной выборке штаммов не выявлены.

Специфичный пептид 3062 Да, присутствующий у штаммов основного подвида, ранее идентифицирован как фрагмент молекулы активатора плазминогена (Pla), полученный в результате отщепления от зрелой формы молекулы Pla [Lasch P. et al., 2010]. Присутствие пептидного фрагмента

3062 Да в масс-спектрах *Y. pestis* свидетельствует о наличии у штаммов основного подвида фрагментированной эволюционно более молодой изоформы β -Pla [Sodeinde O.A. et al., 1988]. Отсутствие фрагмента 3062 Да в масс-спектрах алтайского, улегейского и гиссарского подвидов указывает на наличие нефрагментированной α -изоформы молекулы Pla.

Таким образом, проведенный анализ масс-спектров выявил специфичные пептиды для штаммов основного, кавказского и гиссарского подвидов, позволяющие дифференцировать штаммы основного и неосновных подвидов по наличию специфичных белковых маркеров.

Совершенствование и разработка новых микробиологических методов изучения эффективности дезинфицирующих средств

Федорова Л.С., Скопин А.Ю., Белова А.С., Левчук Н.Н., Серов А.А.

ФБУН «НИИ дезинфектологии», г. Москва

Для эффективного осуществления дезинфекционных мероприятий требуются дезинфицирующие средства (ДС), обладающие необходимым (достаточным) антимикробным действием в отношении возбудителей инфекционных болезней. В связи с этим на этапе предрегистрационных испытаний ДС проводится изучение их антимикробного действия и разработка режимов обеззараживания эпидемиологически значимых объектов путем моделирования в лаборатории условий, близких к практическим. Так как появляются новые виды возбудителей инфекций, новые объекты и технологии обработки, возникает необходимость совершенствования и разработки новых методов оценки эффективности ДС.

Проведенные сравнительные испытания устойчивости тест-микроорганизмов, принятых в России и за рубежом, показали возможность применения для оценки эффективности ДС и тех, и других микроорганизмов.

Наиболее адекватной моделью для оценки туберкулоцидного действия ДС была определена *Mycobacterium terrae*, имеющая более высокую устойчивость к большинству ДС, чем применявшаяся ранее *Mycobacterium B5*. Для изучения фунгицидного действия были предложены *C. albicans* – представитель возбудителей кандидозов, *T. gypseum* – представитель возбудителей дерматомикозов и *A. niger* – представитель плесневых грибов.

Появление новых комбинированных технологий, позволяющих совместить в одном процессе дезинфекцию столовой и лабораторной посуды с ручной и механизированной мойкой, больничного белья со стиркой медицинских изделий, предметов ухода за больными в установках и т.д., поставило задачу разработки методов оценки эффективности сочетанного действия на микроорганизмы ДС и других факторов – мойки, температуры, давления и др.

Для медицинских организаций предложен новый метод контроля эффективности дезинфекции медицинских отходов в установках; разработана новая методика оценки

чувствительности к ДС госпитальных штаммов микроорганизмов (МУ 3.1.5.3439-17).

С учетом специфики объектов, микрофлоры и требований к обеззараживанию разработаны методы оценки эффективности ДС при дезинфекции объектов на предприятиях пищевой, биотехнологической и фармацевтической промышленности.

Внедрение и использование новых методов тестирования ДС позволяет более точно определять их активность и разрабатывать эффективные режимы обеззараживания различных объектов.

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. Молекулярно-генетические исследования резистентности к антимикробным препаратам

Хабалова Н.Р., Кафтырева Л.А., Бутаев А.К.

ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», г. Санкт-Петербург;
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в РСО-Алания», г. Владикавказ

Широкое распространение в лечебно-профилактических учреждениях возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, проявляющих устойчивость к антибактериальным препаратам различных групп, требует более детального изучения механизмов резистентности с помощью молекулярно-генетических методов диагностики. Наиболее уязвимой группой риска остаются пациенты отделений реанимации и интенсивной терапии, а также хирургических стационаров, которые чаще других категорий пациентов подвержены инвазивным вмешательствам с диагностической и лечебной целью, длительной антибактериальной терапии, что на фоне сниженного иммунитета повышает риск возникновения гнойно-септических осложнений, вызванных условно-патогенными микроорганизмами с выраженной антибиотикорезистентностью.

Ведущими возбудителями в этиологической структуре ГСИ, зарегистрированных в Республике Северная Осетия-Алания, являются *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonas aeruginosa*, на долю которых приходится в хирургических отделениях 90,1%, в ОРИТ – 78,2%. ИСМП в хирургических отделениях и ОРИТ вызывали как чувствительные, так и резистентные штаммы микроорганизмов. Установлена высокая доля (73,9%) нечувствительных к АМП штаммов возбудителей ИСМП. В штаммах ведущих возбудителей ИСМП выявлена устойчивость к препаратам выбора для лечения тяжелых инфекций: 44,9% штаммов *Pseudomonas aeruginosa* нечувствительны к карбапенемам; 25,7% штаммов *Enterobacteriaceae* – к цефалоспорином расширенного спектра; 15,6% штаммов *Staphylococcus spp.* относились к группе метициллинрезистентных и были устойчивы ко всем бета-лактамам антибиотикам. Выявлен высокий уровень резистентности штаммов *K. pneumoniae* и *E. coli* к цефалоспорином 3–4-го поколения за счет продукции БЛРС генетической группы СТХ-M1 (54,5%

и 22,6% соответственно). Штаммы *Enterobacteriaceae* – возбудители ИСМП характеризовались внутривидовой гетерогенностью по спектру резистентности к АМП- и PFGE-профилям.

Этиология инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в Республике Северная Осетия-Алания

Хабалова Н.Р., Кафтырева Л.А., Бутаев А.К.

ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», г. Санкт-Петербург;
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в РСО-Алания», г. Владикавказ

В Республике Северная Осетия-Алания ИСМП ежегодно регистрируется в виде ГСИ новорожденных, ГСИ родильниц, послеоперационных и постинъекционных инфекций, ОКИ, инфекций мочевыводящих путей, вирусных гепатитов В и С, сальмонеллезных инфекций, прочих инфекционных заболеваний. Показатель заболеваемости на 1000 госпитализированных составил 0,96, что ниже данных по отдельным регионам Российской Федерации. Заболеваемость в ОРИТ и хирургических стационарах составила 31,5% от всех ИСМП и 36,4% от числа ИСМП, регистрируемых в учреждениях стационарного типа. За последние годы наблюдалась тенденция к повышению заболеваемости среди пациентов ОРИТ и хирургических стационаров. В ОРИТ и стационарах хирургического профиля послеоперационные инфекции составили 52,8% от числа ГСИ, постинъекционные инфекционные осложнения – 20,4%, внутрибольничные пневмонии, инфицирования трахеостомических отверстий и верхних дыхательных путей – 17,5%, инфекции мочевыводящих путей – 9,3%. В ОРИТ из проб биоматериала пациентов достоверно чаще изолировались штаммы *P. aeruginosa* (45,9%), бактерии рода *Staphylococcus* (20,9%) и микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (11,4%). В ОРИТ суммарно на эти микроорганизмы приходилось более 2/3 всех находок. На другие микроорганизмы приходилось менее 2% находок. В хирургических отделениях частота выделения из биоматериала *Staphylococcus spp.* и *Enterobacteriaceae* была выше (в 38,7 и 37,9% соответственно). Штаммы *P. aeruginosa* выделяли в 13,5%, то есть в 3,5 раза реже, чем в ОРИТ. Спектр ведущих микроорганизмов отличался в зависимости от исследованного биоматериала. Из отделяемого верхних дыхательных путей чаще выделяли *P. aeruginosa* (36%), *S. aureus* (16,9%) и *E. coli* (9,8%). Из ран чаще изолировали *S. aureus* (38,7%), *E. coli* (19,3%), *P. aeruginosa* (13,5%), *P. mirabilis* (9,6%), *Enterococcus spp.* (7,7%) и *K. pneumoniae* (3,6%). Бактериологическое исследование проб крови показало, что наиболее значимыми возбудителями являются КОС (63,2%), *P. aeruginosa* (15,2%), энтеробактерии (8,6%) и *S. aureus* (6,3%). Ведущими микроорганизмами, выделенными при исследовании мочи, являлись: *E. coli* (18,2%), *Enterococcus spp.* (17,1%), КОС (16,0%), *P. aeruginosa* (11,4%), *S. aureus* (8,5%), *K. pneumoniae* (7,4%) и *P. mirabilis* (4,1%).

Эффективность бактериофаготерапии препаратами комбинированных фагов пациентов с хроническим тонзиллитом и носителей золотистого стафилококка

Хараева З.Ф., Ловпаче З.Н., Азаматова Э.К.

ГОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», г. Нальчик

В последние годы во всем мире отмечается значительное снижение чувствительности возбудителей различных заболеваний к антибиотикам. В тоже время наблюдается неуклонный рост случаев хронического течения инфекции и постреконвалесцентного бактерионосительства. Среди возможных путей санации очагов хронической инфекции бактериофаготерапия отличается полным отсутствием побочных эффектов. Однако при изменении рецепторного фенотипа микробов чувствительность бактерий к бактериофагам может быть недостаточной. В связи с этим целью исследования было исследование эффективности бактериофаготерапии комбинированными препаратами «Пиополифаг» и «Секстафаг» как метода неантибиотического лечения пациентов с хроническим тонзиллитом в межрецидивный период и способа санации носоглотки у бактерионосителей золотистого стафилококка.

Обследованы пациенты двух групп: 1) 53 пациента (22 мужчины и 31 женщина в возрасте от 22 до 45 лет) с хроническим тонзиллитом в стадии ремиссии и 2) 54 бактерионосителя (25 женщин, 29 мужчин в возрасте от 18 до 47 лет). У пациентов обеих групп при бактериологическом анализе микрофлоры зева и носа были выделены штаммы *Staphylococcus aureus*. Идентификацию выделенных культур проводили по биохимическим и культуральным признакам. Для оценки эффективности методов неантибактериальной терапии отдельным группам лиц была назначена бактериофаготерапия препаратом «Пиополифаг» (Биофаг ДП Иммунопрепарат, Россия) в течение 10 дней или «Секстафагом» (ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России). Спустя 2 нед было проведено повторное бактериологическое обследование пациентов. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента.

Было выявлено, что бактериофаготерапия препаратом «Пиополифаг» уменьшала общую обсемененность зева и носа (с 10^{4-5} до 10^{2-3} б/мм²). Однако полной элиминации штаммов золотистого стафилококка не было, единичные колонии остались у 17 пациентов с хроническим тонзиллитом (32,0%). Терапия препаратом «Секстафаг» привела к более значительному уменьшению выделения стафилококков у больных с хроническим тонзиллитом – единичные колонии золотистого стафилококка остались у 9 пациентов (16,9% случаев). Оба препарата оказались эффективны у носителей, при повторном посеве штаммов *S. aureus* не выявлено.

Таким образом, бактериофаготерапия комбинированными препаратами является эффективным и безопасным методом санации носоглотки и зева у бактерионосителей и может быть частью комплексной терапии у пациентов с хроническим тонзиллитом в межрецидивный период.

Антибактериальная активность пектиновых растворов по отношению к клиническим штаммам микроорганизмов

Хатко З.Н.¹, Ашинова А.А.¹, Хиштова Н.С.², Стенина О.Н.²

¹ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Адыгея», г. Майкоп

Пектиновые растворы являются вспомогательным средством при приготовлении многих лекарственных форм. Введение низкометоксилированного пектина может усилить терапевтический эффект или снизить побочное негативное действие лекарственных препаратов, в том числе антисептиков.

Исследованы антибактериальные свойства пектиновых композиций, изготовленных на основе высокоочищенного свекловичного и промышленного яблочного пектинов в разных структурных формах. Установлено, что высокоочищенный свекловичный пектин обладает выраженным антибактериальным действием по отношению к микроорганизмам *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. faecalis*. Максимальная степень задержки роста микроорганизмов наблюдается при концентрации пектинов в растворе 1...5 % [Хатко З.Н., 2012].

Цель работы – исследование антибактериальной активности разных видов пектиновых растворов и их комбинаций в зависимости от густоты посева клинических штаммов микроорганизмов.

Исследовали пектиновые растворы яблочного, цитрусового, свекловичного пектинов, их комбинаций с концентрацией 1% и 3%.

В работе использовали следующие клинические штаммы микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*. Все штаммы микроорганизмов выделены в бактериологической лаборатории Центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора Республики Адыгея.

Для определения антибактериальной активности пектиновых растворов готовили взвесь бактериальных клеток на физиологическом растворе поваренной соли. Использовали культуру микроорганизмов на плотном питательном агаре [МУК 4.2.1890-04]. Бактериальную массу снимали петлей, и пользуясь оптическим стандартом мутности (СО БАК) 5 и 10 ед. мутности.

Исследуемые пектиновые растворы из яблочного, цитрусового и свекловичного пектинов, а также их комбинации задерживают рост клинических штаммов микроорганизмов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, т.е. проявляют антибактериальную активность. Установлено, что показатель антибактериальной активности пектиновых растворов по отношению к клиническим штаммам исследуемых микроорганизмов зависит от вида, концентрации, комбинаций пектинов и вида микроорганизмов.

О чувствительности к антибактериальным препаратам штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в 2015–2016 гг. в Алтайском высокогорном природном очаге чумы

Хвойнова И.Г., Токмакова Е.Г., Витязева С.А., Шестопапов М.Ю., Балахонов С.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск

Чума в современном мире, несмотря на успехи медицины, остается одной из социально значимых эпидемиологических угроз. Существование природных очагов чумы сохраняет и определяет постоянную угрозу возникновения эпидемических проявлений. В последнее время появились факты, свидетельствующие о значительном увеличении эпидемиологического потенциала сибирских горных природных очагов, в частности Алтайского высокогорного. Эти обстоятельства указывают на потенциальную возможность возникновения и распространения серьезных эпидемических осложнений, то есть требуют особого внимания к осуществлению эпидемиологического надзора, а также постоянного мониторинга чувствительности возбудителя чумы к антибактериальным препаратам (АБП) широкого спектра действия.

Цель работы – определение чувствительности к АБП штаммов чумного микроба, выделенных от больных чумой людей и объекта охотничьего промысла местного населения – алтайского сурка *Marmota baibacina* в 2015–2016 гг. в Республике Алтай.

Всего было изучено 6 штаммов *Y. pestis*, три из которых от больных людей с установленным диагнозом бубонной формой чумы и три – из изъятых у них при эпидемиологическом расследовании тушек сурков. Использовали семь АБП: стрептомицин, канамицин, амикацин, ципрофлоксацин, цефотаксим, гентамицин, доксициклин. Чувствительность к ним определяли методом серийных разведений в агаре Мюллера-Хинтона согласно методическим указаниям (МУК) 4.2.2495-09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам». Контрольными штаммами служили *Escherichia coli* 25922 ATCC и *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Значения чувствительности контрольных штаммов соответствовали приведенным в МУК 4.2.2495-09. АБП подавляли рост исследуемых штаммов в следующих концентрациях: стрептомицин 4 мг/л, канамицин 2–8 мг/л, амикацин 2–4 мг/л, ципрофлоксацин 0,032–0,064 мг/л, цефотаксим 0,008 мг/л, гентамицин 1–2 мг/л, доксициклин 1–2 мг/л. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) АБП соответствовали диапазону значений для антибиотикочувствительных штаммов, приведенному в МУК 4.2.2495-09, кроме ципрофлоксацина и доксициклина. МПК этих препаратов были выше, хотя и не достигали пороговых величин.

Таким образом, все тестированные штаммы являются чувствительными к исследованным АБП. Результаты исследования были использованы для лечения больных, а также в целях формирования резерва АБП для лечения чумы в учреждениях здравоохранения Республики Алтай.

Бактериологическое исследование степени микробной загрязненности кожи рук

Хиштова Н.С.¹, Малакеева Ю.², Фейт К.², Дайни Х.², Альварадо М.К.²

¹ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Адыгея», г. Майкоп;

²ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп

Гены определяют устойчивость или предрасположенность к заболеваниям. Это новое направление в науке – этногенетика [Э.К. Хуснутдинова, 2013]. Кроме характерной микрофлоры, на коже присутствуют и транзиторные микроорганизмы, быстро исчезающие под влиянием бактерицидных свойств кожи [Поздеев О.К., 2005].

Цель работы. Определить количественный и качественный состав микрофлоры рук. Оценить степень «чистоты рук» у лиц разных этнических групп.

Материалы и методы. В работу были взяты 40 волонтеров-студентов: 20 уроженцев Северного Кавказа, 20 уроженцев Ближнего Востока (Сирия, Ирак). Посев кожи рук производился методом «бакпечаток»: прикосновением кожи большого пальца руки к плотной питательной среде на чашке Петри [Волченко Н.Н. и др., 2008]. Руки перед посевом не мыли и не обрабатывали антисептическими салфетками. Посевы на питательных средах инкубировали в термостате: агар Эндо, кровяной агар – 37°C, 24 ч; энтерококковый агар – 37°C, 48 ч; агар Сабуро – 24°C, 96 ч. Учет проводился двумя способами: визуальным – подсчитывалось общее количество колоний и дифференцированный подсчет однотипных колоний и микроскопическим – окраска по Граму. Идентификация проводилась по морфологии колоний, наличию ферментативной и гемолитической активности. Проводился подсчет микроорганизмов (КОЕ). Отпечаток пальца имеет площадь около 1 см². Площадь ладони составляет около 150 см² (собственные подсчеты). Зная число выросших колоний, можно предположить, сколько всего микробов может находиться на одной руке.

Результаты. У представителей Северного Кавказа частота встречаемости стафилококков и микрококков составила 100%, из них в 18% выявлялись гемолитические штаммы. Стрептококки в ассоциации с другими кокками обнаруживались в 4,5%, в монокультуре – не встречались. Выявилась большая частота встречаемости энтеробактерий – 22,7% и плесневых грибов – 13,6%. Грамположительные палочки и энтерококки не выявлялись. Среднее значение бактериальной загрязненности кожи рук составило 44 колонии, всей ладонной поверхности – 6600 КОЕ. У уроженцев Ближнего Востока частота встречаемости стафилококков и микрококков составила 94,5%, гемолитические штаммы не выявлялись. Стрептококки обнаруживались в монокультуре – 5,6%. Выявилась большая частота встречаемости энтеробактерий – 11,1% и энтерококков – 5,6%. Грамположительные палочки выявлялись в 11,1%. Плесневые грибы не обнаружены. Среднее значение бактериальной загрязненности составило 50 колоний, среднее приблизительное число бактерий на всей ладонной поверхности – 7500 КОЕ.

Кокковая флора выделялась в 100% случаев, из них гемолитические штаммы определялись в 10%. У уроженцев Северного Кавказа в 18% выявлялись гемолитические штаммы кокковой флоры и в 13,6% – плесневые грибы (у представителей Ближнего Востока их не было), в 22,7% – энтеробактерии (в 2 раза выше, чем у представителей Ближнего Востока). Стрептококки в монокультуре, энтерококки и грамположительные палочки выявлялись только у представителей Ближнего Востока в 5,6%, 5,6% и 11,1% случаев соответственно. Среднее значение бактериальной загрязненности кожи пальцев рук у уроженцев Северного Кавказа составило 44, у представителей Ближнего Востока – 50 КОЕ.

Выводы. В обеих группах выделялись бактерии группы кишечной палочки. У уроженцев Северного Кавказа выше частота обнаружения условно-патогенных бактерий и микроорганизмов, не свойственных кожной микрофлоре. Среднее приблизительное число бактерий на всей ладонной поверхности выше у представителей Ближнего Востока на 10%.

Характеристика иммуногенных свойств рекомбинантного пептидогликан-ассоциированного липопротеина (PAL) *Legionella pneumophila*

Хлынцева А.Е., Марьин М.А., Зенинская Н.А., Рябко А.К., Козырь А.В., Колесников А.В., Фирстова В.В., Шемакин И.Г.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk

Пептидогликан-ассоциированный липопротеин (PAL) является высококонсервативным антигеном возбудителя легионеллезной инфекции *Legionella pneumophila*. PAL представляет собой заякоренный белок внешней мембраны, часть из которого ориентирована на поверхность бактерии, а вторая часть – в сторону пептидогликанового слоя. PAL является перспективным в качестве компонента вакцинного препарата и может использоваться при конструировании диагностических тест-систем. В нашей лаборатории получен рекомбинантный PAL *Legionella pneumophila* (rPAL) в гетерологичной системе экспрессии в составе химеризованного белка His-SUMO-PAL, содержащего гексагистидиновый тэг для хроматографической очистки белка-предшественника, и белок PAL, разделенные расщепляемым SUMO-протеазой пептидом, который позволяет отделить белок His-SUMO от белка PAL с восстановлением его нативной первичной структуры.

Цель работы – охарактеризовать иммуногенные свойства рекомбинантного PAL *Legionella pneumophila* (rPAL).

Мышей линии BALB/c иммунизировали путем двукратно, с тридцатидневной экспозицией, подкожного введения rPAL, эмульгированного с полным (первая иммунизация) и неполным (вторая иммунизация) адьювантом Фрейнда. Бустер-дозы rPAL в физиологическом растворе вводили внутривенно. Проверку титра специфичности антител у иммунизированных мышей проводили непрямой твердофазным ИФА. Токсичность rPAL определяли на клеточной линии J774, лимфоцитах мышей в МТТ-тесте с использова-

нием витального красителя 7-AAD. Способность rPAL активировать лимфоциты оценивали по появлению маркеров активации на поверхности клеток. Для этого у иммунных и интактных мышей выделяли спленциты и инкубировали в полной питательной среде в присутствии 10 мкг/мл rPAL и без него для последующего выявления активационных молекул CD69 (24ч) и CD25 (48ч) на поверхности Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) и В-лимфоцитов (CD19⁺). Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитофлюориметре FACSCalibur, BD (США). rPAL сохранил иммуногенные свойства нативного PAL, что подтвердилось в способности rPAL индуцировать синтез антител у мышей, специфически активировать Т- и В-лимфоциты (увеличение CD69+ до 11%, а CD25-позитивных лимфоцитов до 35%). rPAL не оказывал токсического действия на клеточную линию J774 и лимфоциты мышей даже в дозе 50 мкг/мл.

Выявление ДНК клинически значимых микроорганизмов рода *Vibrio* в объектах окружающей среды Приморского края в мультиплексной ПЦР

Хунхеева Ж.Ю.¹, Миронова Л.В.¹, Хоменко Т.В.², Алленов А.В.², Балахонов С.В.¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск;

²ФКУЗ «Приморская противочумная станция», г. Уссурийск

Vibrio spp. насчитывает свыше 40 видов микроорганизмов, способных вызывать острые кишечные инфекции, септицемии, раневые инфекции у восприимчивого макроорганизма, тем самым представляя опасность для него. Значимость отдельных микроорганизмов рода в инфекционной патологии Приморского края обусловлена разнообразием вибриофлоры поверхностных водоемов, представленной преимущественно такими вибрионами, как *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. metschnikovii*, и возможностью их вызывать заболевания у людей.

Для ускоренного выявления в пробах воды поверхностных водоемов микроорганизмов рода *Vibrio* сконструирован мультиплексный формат ПЦР, направленный на детекцию видоспецифических генов *toxR* (*V. cholerae*, *V. fluvialis*), *hutA* (*V. parahaemolyticus*), *infC* (*V. metschnikovii*) и *dnaJ* (*V. alginolyticus*). В ходе мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов Приморского края с применением тест-системы исследовано 14 проб – сред обогащения, из которых коммерческим набором Рибо-преп экстрагирована ДНК. По результатам ПЦР установлено отсутствие искомым генетических детерминант в двух пробах, подтвержденное отрицательным результатом бактериологического исследования, в 11 случаях выявлен одновременный амплификационный ответ по наличию детерминант парагемолитического (*hutA*) и алгинолитического (*dnaJ*) вибрионов. Бактериологически из данных десяти проб воды в семи случаях изолирован *V. alginolyticus*, в двух – *V. parahaemolyticus*, по одному случаю – одновременное бактериологическое выделение двух возбудителей и отсутствие результата. Наличие же гена хо-

лерного вибриона *toxR* установлено в одной пробе воды, из которой изолирован *V. cholerae* не O1/O139.

Таким образом, сконструированная ПЦР тест-система позволяет выявлять клинически значимые микроорганизмы рода *Vibrio* в поверхностных водоемах Приморского края. Ситуация с одновременным ответом в ПЦР по двум детерминантам различных возбудителей и бактериологическая изоляция одного из них, возможно, обусловлена высокими адаптационными способностями алгинолитического вибриона к содержанию солей, содержащихся в морской воде.

Метагеномный анализ микробиоты десневой биопленки и молекулярная диагностика пародонтита

Царев В.Н.¹, Арутюнов С.Д.¹, Бабаев Э.А.¹, Балмасова И.П.¹, Ильина Е.Н.², Габиев А.Г.³

¹ФГБОУ ВО «Московский медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», г. Москва;

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», г. Москва;

³ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», г. Москва

Известно, что маркерами развивающегося пародонтита являются анаэробные прокариоты так называемого «красного комплекса» или пародонтопатогенные виды 1 порядка – *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* серотипа b. Вместе с тем, активно изучается роль пародонтопатогенных видов 2 порядка, относящихся к таксонам *Bacteroidaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Treponemataceae*.

Целью исследования являлась оценка возможностей молекулярных методов диагностики пародонтита, в том числе сочетанного с сахарным диабетом 2 типа.

Проведено обследование с использованием методов молекулярной диагностики (набор реагентов «МультиДент-5» ООО НПФ «ГенЛаб», РФ) 52 человек молодого работоспособного возраста обоих полов (23–40 лет), в том числе: 30 пациентов с хроническим пародонтитом средней степени тяжести и 22 человека, у которых хронический пародонтит сочетался с сахарным диабетом II типа. При анализе метагенома зубодесневой борозды, основанном на секвенировании 16S ДНК бактерий десневой биопленки, статистически значимым было различие по наличию при пародонтите маркерной ДНК перечисленных видов, выявленной методом ПЦР. Представители семейств *Porphyromonadaceae* и *Prevotellaceae* в случае сочетания пародонтита с сахарным диабетом II типа встречались в 1,9 раза чаще, как правило, в ассоциациях с пародонтопатогенными видами 2 порядка. Кроме того, при пародонтите впервые отмечено достоверное снижение в десневой биопленке бактерий семейства *Sphingobacteriaceae*, участвующих в продукции и обмене сфинголипидов, которые, возможно, играют роль формировании компонентов мантии нормальной биопленки, что по новому позволяет объяснить структурные различия биопленок, формируемых в норме и при пародонтите, выявленные

ранее с помощью сканирующей электронной микроскопии. Полученные результаты свидетельствуют в пользу изменения микробиоты при рассматриваемой патологии и возможного патогенетического и диагностического значения наблюдаемых изменений.

Новые подходы к лабораторной диагностике метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*

Цветкова А.И., Сидорова Н.А.

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск

Метициллинрезистентные штаммы *S. aureus* (MRSA) вызывают разнообразные клинические формы внутрибольничных инфекций, включая бактериемию, пневмонию, синдром септического шока, септический артрит, остеомиелит и энтероколиты. Согласно первоисточникам, начало распространения MRSA относится к 1961 г. Позднее доказано, что эти штаммы аккумулируют гены множественной лекарственной устойчивости, обеспечивая уникальные механизмы резистентности микроорганизма к полусинтетическим пеницилинам и цефалоспорином. Существуют различные способы проведения идентификации MRSA штаммов, однако определение некоторых вариантов, особенно коагулазонегативных, встречает серьезные трудности. Известные методы определения видовой принадлежности микроорганизма (Акатов А.К., Зуева В.С., 1983; Kloos W.E., Schieüer K.H., 1975) с использованием дифференциально-диагностических сред являются трудоемкими, требуют длительной инкубации, большого набора реагентов и мало приемлемы для клинических лабораторий. Для оптимизации лабораторной диагностики MRSA штаммов необходимо внедрение в практику специальных тест-систем. Однако имеющиеся тесты лишь идентифицируют микроорганизм на основании ферментативной активности или других биохимических показателей. В России разработаны наборы для идентификации *S. aureus*, в НПО «Питательные среды» создана микротест-система, но производственный выпуск данных препаратов отсутствует. За рубежом производятся тест-системы: Staph Express Count Plate, API-Staph, API-Staph-Ident. Аналогом тест-системы однократного применения может служить петрифилм для выявления и количественного учета MRSA штаммов в виде тест-пластины, содержащей модифицированную питательную среду, водорастворимый гель, оксациллин в дозах более 2 мг/л. На основании разработки и внедрения в практику диагностики MRSA штаммов экспресс-системы однократного применения станут возможными: стандартизация лабораторной диагностики MRSA штаммов; сокращение трудоемкости, потребности в лабораторной посуде, питательных средах и ускорение сроков идентификации MRSA штаммов; выявление на ранних этапах стафилококковой инфекции и скрытых форм носительства; предупреждение появления персистирующих вариантов *S. aureus*; предупреждение развития рецидивов и осложнений при стафилококковой инфекции, а также разработка рациональных схем антибиотикотерапии.

Вариабельность гликолитических профилей штаммов *Bacillus anthracis* с различным комплексом фенотипических и генетических характеристик

Цыганкова О.И., Котенева Е.А., Калинин А.В.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», г. Ставрополь

Возможность утилизировать углеводы является важным свойством микроорганизмов в обеспечении жизнеспособности вида и может отражать филогенетические связи с близкородственными сапрофитами, а также проводить внутривидовую дифференциацию. Удобной моделью для изучения этих вопросов, наряду с природными изолятами, могут служить изогенные группы вариантов сибиреязвенного микроба, охарактеризованные по фенотипическим свойствам и генам основных факторов патогенности. Были выявлены группы культуральных вариантов штаммов, наиболее отличающиеся по большому количеству фенотипических свойств и генетических характеристик, исключая наличие плазмид вирулентности *B. anthracis* рХО1 и рХО2. Среди 9 штаммов сибиреязвенного микроба, использованных в данной работе, присутствовали парные культуры из изогенных групп 1(СО), 140 П, 12/16. Для сравнения был взят штамм *B. cereus* 16.

Цель работы: изучение способности культур *B. anthracis* гидролизовать широкий набор из 49 углеводов, поиск различий между штаммами и корреляции с другими их свойствами.

Способность гидролизовать те или иные углеводы (49 наименований) определяли при помощи набора тестов API 50 CH.

Полученные результаты свидетельствуют о различии штаммов *B. anthracis* в способности ферментировать крахмал, гликоген, D-туранозу и глюконат калия. Все культуры сибиреязвенного микроба, имеющие фенотип Cap(CO₂)⁺(O₂)⁻Tox⁺ProtA⁺Hly⁺Lec⁻Trp⁺ и одинаковые MLVA-, Seb-Bams- и SNP-генотипы, характерные для высоковирулентных штаммов, проявляли выраженную гидролитическую активность по отношению к крахмалу и гликогену, слабую по отношению к туранозе, и не расщепляли глюконат калия.

Штаммы с фенотипами Cap(CO₂)⁺(O₂)⁺Tox⁻ProtA⁻Hly⁻Lec⁻Trp⁻ и Cap(CO₂)⁺(O₂)⁺Tox⁻ProtA⁻Hly⁻Lec⁻Trp⁻ и одинаковые MLVA-, Seb-Bams- и SNP-генотипы, характерные для штаммов со сниженной вирулентностью и наиболее отличающиеся от аналогичных характеристик предыдущей группы, не гидролизовали крахмал, гликоген и туранозу, выявляя слабую активность по отношению к глюконату калия.

Культура *B. cereus* 16, в отличие от *B. anthracis*, не ферментировала D-мальтозу.

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали вариабельность спектров утилизируемых углеводов штаммов возбудителя сибирской язвы и выявили выраженную корреляцию данного признака с определенными комплексами фенотипических свойств и MLVA-, Seb-Bams- и SNP-генотипами.

Выяснение значения отсутствия способности ферментировать крахмал и гликоген для различий в биологических свойствах штаммов сибиреязвенного микроба требует более детального изучения.

Возможности применения транспортной среды в лабораторной диагностике дифтерийной инфекции

Чагина И.А.¹, Борисова О.Ю.¹, Гадуа Н.Т.¹, Скворцов А.Г.²

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского», г. Москва;

²ЗАО «ФИРМА ГАЛЕН», г. Москва

Основной задачей лабораторной диагностики дифтерийной инфекции является идентификация возбудителя с помощью минимального количества диагностических тестов, необходимых, достаточных и специфичных для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки. Одним из важнейших этапов исследования является преаналитический этап – взятие и доставка патологического материала, от которого зависит эффективность проведения и своевременность выдачи окончательного ответа. В ранее проведенных референс-центром по дифтерии и коклюшу исследованиях было показано, что использование агаризованных коммерческих транспортных сред Стюарта и Эймса, предназначенных для исследования микрофлоры ротоглотки и носа, приводит к потере патологического материала при обследовании на дифтерию. На основании этого были сформулированы положения по правилам взятия патологического материала на дифтерию в действующих СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Учитывая расширение рынка транспортных сред, нами проведены сравнительные экспериментальные исследования, позволяющие прогнозировать эффективность бактериологической диагностики дифтерийной инфекции при использовании коммерческой транспортной среды: «Тупферы для мазков в пробирке со средой Эймса без угля» (Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса) производства Medical Wire & Equipment Co. (Bath) Ltd., Великобритания (MWE). В эксперименте имитировали условия работы лечебно-профилактических организаций по хранению тампонов с патологическим материалом на дифтерию до их транспортировки в лабораторию – при различной температуре и в течение разных промежутков времени. Экспериментальные исследования проводили на токсигенном штамме *C. diphtheriae gravis* №665 (ГКПМ-Оболensk). Делали три линейки десятикратных разведений путем последовательного разведения бактериальной культуры. Все разведения контролировали путем высева на кровяно-теллуритовую среду. Модельные эксперименты проводили на искусственно инфицированных образцах (имитантах), которые готовили путем пулирования тампонов приготовленными разведениями трех концентраций бактериальной культуры. Исследования показали, что использование тампонов Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса сохраняло высеваемость возбудителя. Таким образом, тампоны Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса могут быть рекомендованы для взятия и транспортирования патологического материала на дифтерию в бактериологических лабораториях.

Опыт использования моющих средств «Пемос», «Сульфонол НП 1» и «Детергент 7X» в качестве поверхностно активных веществ

Чекан Л.В., Тюрин Е.А.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

Для достижения лучшего эффекта адгезии к рабочим поверхностям в дезинфицирующий раствор перекиси водорода в рабочей концентрации добавляют моющие средства – поверхностно активные вещества. Производимые на сегодняшний день моющие средства имеют сложный состав, включая анионные и неионные ПАВ, добавки солей, соду, силикат натрия, фосфаты или цеолиты, отбеливатели, энзимы, отдушки и цветные добавки. Мониторинг применения рабочих растворов перекиси водорода в лабораториях и отделах ГНЦ ПМБ показал, что использование некоторых современных препаратов ПАВ существенно влияет на концентрацию действующего вещества и может снижать ее в рабочих растворах перекиси водорода. Это является актуальным при проведении работ с особо опасными возбудителями, со споровыми формами ПБА. Как показали результаты исследований, наблюдалось значительное снижение концентрации рабочих растворов перекиси водорода при использовании в качестве ПАВ моющего средства «Пемос». Было выявлено, что с повышением температуры воздуха концентрация перекиси в рабочем растворе дезинфицирующего средства уменьшалась во всех опытных образцах. Так, при температуре воздуха плюс 24°C значительное снижение отмечали уже через 4 ч, а при плюс 30°C – через 2 ч. При 18-часовой экспозиции во всех опытных образцах отмечалось резкое снижение концентрации рабочих растворов перекиси водорода. Снижение концентрации рабочего раствора перекиси водорода при добавлении средства «Пемос», вероятно, связано с тем, что в его состав входят энзимы и химический отбеливатель. При применении в качестве ПАВ средства «Сульфонол НП 1» было установлено, что концентрации рабочих растворов перекиси водорода также снижались, но не так резко, как при добавлении препарата «Пемос». При использовании препарата «Детергент 7X» в качестве ПАВ было показано, что концентрации рабочих растворов перекиси водорода практически не изменялись в течение 18 ч эксперимента. Незначительные отклонения от исходной концентрации наблюдали в отдельных сериях экспериментов, которые были в рамках статистической погрешности, что позволяет рекомендовать препарат «Детергент 7X» в качестве ПАВ для рабочих растворов перекиси водорода.

Роль сигнальных молекул микробиоты человека в диагностике инсульта

Червинец В.М., Червинец Ю.В., Беляева Е.А.

ФГБОУ ВО «Тверской государственной медицинской университет», г. Тверь

Заболевания нервной системы в настоящее время представляют собой большой интерес из-за их большой распро-

страненности. Среди них на первом месте стоит инсульт, который приводит к потере трудоспособности, нарушает нормальное функционирование организма и, как следствие, ведет к смертельному исходу. Инсульт могут вызывать разные причины, но важную роль в развитии заболевания играют разнообразные регуляторы внутри- и межклеточной коммуникации, или сигнальные молекулы. Среди них выделяют известные биоактивные вещества (аминокислоты, биогенные амины, пептиды, катехоламины, эндорфины, гормоны и т.д.), а также простейшие по химической структуре газообразные соединения (NO, CO, H₂S, H₂, CH₄, NH₃ и др.), выделяемые микробиотой желудочно-кишечного тракта.

Цель исследования: определение роли низкомолекулярных газовых сигнальных молекул, выделяемых лактобациллами желудочно-кишечного тракта при инсульте.

Материалы и методы. Были выделены 10 штаммов лактобацилл из ротовой жидкости и кишечника здоровых людей в возрасте от 20 до 35 лет г. Твери. Штаммы обладали высокой антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, включая дрожжевые грибы рода *Candida*. Анализ концентрации газовых сигнальных молекул, в мг/мл, выделяемых лактобациллами (CO₂, CH₄, CO, C₂H₆, C₃H₈), проводился с применением газового хроматографа Кристаллюкс 400М, оснащенного детектором по теплопроводности и пламенно-ионизационным детектором, подключенными последовательно, что обеспечивало одновременный анализ горючих и негорючих компонентов. Разделение газовой смеси проводили на трехметровой колонке, заполненной полимером MN270, фракции 100–125 мкм.

Результаты. Было выявлено, что все лактобациллы, выделенные из полости рта, продуцировали углекислый газ (CO₂) и аммиак (NH₃), четверть из них – метан (CH₄), этан (C₂H₆) и угарный газ (CO) в следовых количествах. Практически у всех кишечных штаммов был обнаружен весь изучаемый спектр газовых сигнальных молекул. Ни один штамм лактобацилл не выделял пропан.

Выводы. Информация о газовых сигнальных молекулах микрофлоры желудочно-кишечного тракта даст возможность оценить их влияние на макроорганизм человека, страдающего патологией нервной системы, и позволит предупредить появление и развитие данных заболеваний у всех людей, особенно с предрасположенностью к инсульту.

Результаты микробиологического мониторинга за пищевой продукцией, реализуемой на территории Липецкой области

Черняева Е.В., Ясная Е.С., Христенко Т.А.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Липецкой области», г. Липецк

Липецкая область является развитым индустриально-аграрным регионом, на территории которого действуют 20 птицефабрик, поэтому контроль качества и безопасности пищевой продукции является актуальной задачей. В работе дана оценка результатов исследований пищевой продукции по

микробиологическим показателям качества и безопасности за период с 2005–2016 гг. Всего исследовано 149 368 проб продуктов, проведено 678 068 исследований, из них птицеводческой продукции 5752 и 23 761 соответственно. Исследования проводились с использованием классических бактериологических методик и современных высокоинформативных методов. Выявлено 5454 (3,7%) проб пищевых продуктов, не соответствующих гигиеническим нормативам. В структуре нестандартных исследований лидирующая позиция (66%) принадлежит показателю БГКП (бактерии группы кишечной палочки). На втором месте (27%) – показатели качества: количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), плесневые, дрожжевые грибы. Доля положительных находок условно-патогенных микроорганизмов составила 4%, патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл – 3%, *L. monocytogenes* – 0,1%. Из всего числа обнаруженных патогенных микроорганизмов порядка 80% были выделены из продуктов птицеводства. Доля нестандартных проб составила 5,8%, первое место в птицеводческой продукции занимают случаи обнаружения патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл (47%), на втором месте – бактерии группы кишечной палочки – 35%.

Анализ качества пищевых продуктов по бактериологическим показателям выявил высокую частоту обнаружения нестандартных образцов среди птицеводческой продукции – от 2,6% до 14,4% в разные годы, что превышает удельный вес нестандартных проб среди общего количества исследованных пищевых продуктов в 3 раза. В большинстве случаев продукты питания не соответствовали нормативам по показателю БГКП (бактерии группы кишечной палочки), пробы птицеводческой продукции – по показателю патогенной микрофлоры, в т.ч. сальмонеллы. Среди всех продуктов, загрязненных сальмонеллами, птицеводческая продукция занимает лидирующее место.

Производство готовых питательных сред во ФБУН ГНЦ ПМБ

Шепелин А.П., Новиков С.А., Марчихина И.И., Полосенко О.В., Шолохова Л.П.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболонск

Во ФБУН ГНЦ ПМБ организовано производство препаратов для диагностики инфекционных болезней, оснащенное уникальными технологиями, современным аналитическим, лабораторным и промышленным оборудованием. Номенклатура выпускаемых в ГНЦ ПМБ диагностических препаратов включает в себя более 100 наименований, в том числе латексные тесты, ПЦР-тесты, ИХ-тесты, питательные среды.

В современной России, стремящейся к созданию высокотехнологичных медицинских лабораторий, растет спрос на готовые питательные среды в пробирках, в чашках Петри и в контактных чашках Родека.

С целью внедрения в ГНЦ ПМБ технологии по производству готовых питательных сред, в специальном помещении класса В по ГОСТ Р 52 249-2009 (≤ 10 КОЕ/м³) высокой сте-

пени чистоты была смонтирована экспериментальная линия по розливу питательных сред в чашки Петри.

Технология изготовления готовых питательных сред базируется на требованиях, позволяющих полностью сохранить физико-химические и биологические показатели, разработанные для сухих препаратов. Экспериментальная линия включает в себя автоматическую средоварку Masterclave 09 с контролем температуры при помощи датчика, выводом показателей на дисплей и автоматический модуль для розлива сред в чашки Petriswiss PS900 производительностью до 900 шт./ч.

На этапе внедрения новой технологии был проведен мониторинг и определен перечень сред, необходимых потребителям в наибольшей степени, в который вошли среды общего назначения: ГРМ агар, триптон-соевый агар, а также среды для выделения сальмонелл и шигелл, стафилококков, грибов и т.д. Питательные среды были разлиты в чашки Петри, упакованы по 10 шт. и заложены на хранение при различных температурах. Исследования стабильности физико-химических и биологических свойств по определению сроков годности показали возможность хранения готовых питательных сред в чашках Петри от 6 до 9 мес.

На готовые среды утверждены НД-технические условия, инструкции по применению, промышленные регламенты, имеется действующая программа обеспечения качества, подтвержденная сертификатом ИСО 9001, сертификат качества препарата, позволяющий потребителю исключить входной контроль перед проведением санитарно-бактериологических исследований.

Использование питательных сред ФБУН ГНЦ ПМБ для выявления листерий в пищевых продуктах

Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболонск

В настоящее время наиболее значимым фактором, влияющим на здоровье человека, является микробное загрязнение пищевых продуктов возбудителями «эмерджентных» бактериальных инфекций с пищевым путем передачи, в том числе вызванных бактериями *Listeria monocytogenes*.

ФБУН ГНЦ ПМБ производит Питательный бульон для выделения листерий (ПБЛ) и Питательный агар для выделения листерий (ПАЛ), которые нашли широкое применение в клинической и санитарной бактериологии для выявления возбудителя листериозной инфекции.

В соответствии с ГОСТ Р 32031-2012. и МУК 4.2.1122-02, регламентирующими методы и питательные среды для выявления и определения бактерий *L. monocytogenes* в пищевых продуктах, дополнительно разработаны Бульон Фрейзера, ПАЛКАМ-агар и Селективный бульон для обогащения листерий (бульон UVM).

Материалы и методы. Для оценки эффективности применения питательных сред ФБУН ГНЦ ПМБ проведены микробиологические исследования 20 образцов пищевых про-

дуктов: молока, мяса птицы, колбасы вареной и рыбы на соответствие требованиям ТР ТС 021/2011. Испытания проводились согласно схеме выявления бактерий *L. monocytogenes* в определенной массе или объеме продукта с использованием всего комплекса имеющихся для этого в ФБУН ГНЦ ПМБ сред.

Результаты. Подготовленные образцы пищевых продуктов культивировали в бульонах предобогащения (ПБЛ I, бульоне Фрейзера-I и бульоне UVM I), а затем десятикратные разведения каждого образца инкубировали в средах обогащения – ПБЛ II, бульоне UVM II и бульоне Фрейзера II, после чего производили высев на дифференциальные среды ПАЛ и ПАЛКАМ.

В ходе анализа образцов молока, мяса и колбасы вареной не выявлен рост колоний с характерной для листерий морфологией. При анализе одного из образцов рыбы – «нерка слабосоленая» с неприятным гнилостным запахом наблюдался бактериальный рост: в ПБЛ и бульоне UVM в виде помутнения среды, с появлением «муаровых волн» при встряхивании, в бульоне Фрейзера с почернением среды, а на дифференциальных средах ПАЛ и ПАЛКАМ – рост колоний с почернением среды, свидетельствующим о возможном присутствии листерий.

Характерные на принадлежность к листериям колонии переселили на Питательную среду №1 ГРМ для получения чистой культуры. Ускоренная идентификация при помощи масс-спектрометра Bruker DaltonikMALDI Biotyper подтвердила видовую принадлежность изолятов к *Listeria monocytogenes*.

Вывод. Доказана эффективность использования комплекса питательных сред производства ФБУН ГНЦ ПМБ для выявления возбудителей листериоза при бактериологической оценке качества пищевых продуктов.

Микробиологический контроль пищевых продуктов с применением питательных сред различных производителей

Шепелин А.П., Полосенко О.В.,
Шолохова Л.П., Марчихина И.И.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk

В микробиологической практике широко используются зарегистрированные в Российской Федерации коммерческие питательные среды с гарантированным качеством. Но не исключено, что среды под одним названием, выпускаемые различными фирмами, будут давать разные результаты. Чувствительность этих сред может не соответствовать требованиям, принятым для выявления патогенов в России.

Целью исследования явилось изучение сравнительных характеристик специфической активности питательных сред для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) производств ФБУН ГНЦ ПМБ и ООО НПЦ «БИОКОМПАС-С».

Материалы и методы. При сравнительных исследованиях на среде ООО НПЦ «БИОКОМПАС-С» через 24 ч инкубации посевов при температуре 37°C был отмечен слабый

рост *S. aureus* FDA 209-P, а рост тест-штамма *M. luteus* ATCC 10240 обнаруживался в виде мелких, точечных колоний.

В качестве объектов для определения общего микробного числа (ОМЧ) использовали: молоко сырое, охлажденную грудку тушки птицы, колбасу вареную и слабосоленую рыбу. Для всех продуктов предусмотрен норматив по количеству МАФАнМ, изложенный в ТР ТС 021/2011.

Для определения показателя выбирали разведения, при посевах которых на чашках вырастает не менее 30 и не более 300 колоний. Каждое из разведений засеяно в количестве 1,0 см³ и залито 10 см³ расплавленной и охлажденной до температуры 40–45°C питательной средой (КМАФАнМ) разных производителей. Первичный учет результатов проводили через 18 ч инкубации посевов, окончательный через 72 ч.

Результаты. По визуальной оценке (размеру и пигменту) и количеству выросших колоний всех образцов на питательных средах разных производителей были получены различные результаты. Через 24 ч с учетом посевной дозы и среднеарифметического значения, полученного по всем чашкам, показатель КМАФАнМ на среде производства ГНЦ ПМБ: молока – $3,1 \times 10^5$, тушки птицы – $7,1 \times 10^7$, колбасы вареной – $1,7 \times 10^3$, рыбы – 1×10^9 , производства «НПЦ «БИОКОМПАС-С» – $2,0 \times 10^5$; $5,0 \times 10^6$; 3×10^2 ; 1×10^8 соответственно.

Показатель КМАФАнМ тушки птицы, полученный через 24 ч инкубации на среде ГНЦ ПМБ (более $1,0 \times 10^7$), свидетельствовал о непригодности продукта, в то время как на среде производства ООО НПЦ «БИОКОМПАС-С» данный показатель был значительно ниже и соответствовал микробиологическому нормативу безопасности.

Вывод. Результаты сравнительных испытаний качества сред показали, что КМАФАнМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ, обладая более высокой специфической активностью в первые сутки инкубации посевов, превосходит аналогичные среды по показателю прорастания в несколько раз в зависимости от исследуемого продукта.

Следовательно, диагностическая способность среды позволяет дать объективную и достоверную оценку обсеменности продукта в более короткие сроки и повысить качество микробиологических исследований.

Вопросы безопасной эксплуатации боксов микробиологической безопасности в лаборатории

Щеглова Т.В.

ООО «ВОСТОК ПОСТ», г. Миасс

Бокс микробиологической безопасности является одним из элементов комплекса инженерных систем обеспечения биологической безопасности и предназначен обеспечивать защиту оператора и окружающей среды от аэрозолей, возникающих в процессе работ с потенциально опасными и опасными микроорганизмами.

Необходимость использования боксов микробиологической безопасности при проведении определенных видов работ установлена СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)»

и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Также в Санитарных правилах установлены требования к выбору класса бокса.

Как часть комплекса инженерных систем обеспечения биологической безопасности, бокс выполняет свои защитные функции только при соблюдении требований и правил его эксплуатации.

На протяжении 5 лет мы, аккредитованная испытательная лаборатория, проводим обслуживание и проверку защитной эффективности боксов микробиологической безопасности и на практике сталкиваемся со следующими вопросами в эксплуатации боксов, которые напрямую влияют на безопасность работы в лаборатории.

1. Отсутствие понимания классификации боксов микробиологической безопасности, вследствие чего приобретаются и устанавливаются боксы другого класса, нежели это необходимо.

К примеру, по сложившейся в России практике, «ламинарным боксом ПЕРВОГО класса защиты» ошибочно было принято называть бокс, который по функционированию и назначению коренным образом отличается от бокса микробиологической безопасности 1 класса по ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности». До вступления в силу с 1 декабря 2011 года ГОСТ Р ЕН 12469-2010 не существовало четкого понимания классификации боксов. И даже сейчас, на протяжении нескольких лет с момента вступления в силу данного ГОСТа, ошибки с выбором остаются прежними.

2. Приобретение оборудования, не отвечающего нормативным требованиям. В СП 1.3.3118-13 установлено, что бокс должен соответствовать требованиям стандарта ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности». На практике случается, что для оснащения лаборатории приобретаются боксы, не соответствующие данному стандарту.

3. Установка новых боксов с нарушениями правил эксплуатации, без проверки на защитную эффективность, что иногда ведет к работе в неисправных боксах.

Чаще всего считается, что новые боксы находятся на гарантии, и нет смысла делать проверку на защитную эффективность. На практике возникает следующее:

- при перевозке бокс может быть поврежден и иметь скрытые повреждения установленных HEPA-фильтров. Внешний осмотр этого не сможет выявить;

- не все учреждения сразу вводят в эксплуатацию боксы, иногда они годами хранятся на складе при различных и не самых благоприятных климатических условиях (например, из-за перепадов температур конденсат может повредить электронику системы управления);

- бокс может иметь заводской брак. Не все производители прилагают к боксам копии протоколов приемо-сдаточных испытаний.

4. Несоблюдение требований Санитарно-эпидемиологических правил в части проведения ежегодных обязательных периодических проверок боксов на защитную эффективность.

По статистике, собранной в нашем центре, около 10% боксов имеют повреждения HEPA-фильтров, которые можно

выявить только при проведении проверки целостности фильтров (одна из составляющих проверки на защитную эффективность).

5. Отсутствие грамотного технического обслуживания боксов. Например, выполнение замены HEPA-фильтров без проведения деконтаминации и последующей проверки бокса на защитную эффективность с целью контроля качества установленных фильтров.

6. Отсутствие знаний у персонала лабораторий о правилах надлежащей эксплуатации боксов: избыточная загрузка бокса приборами, работа при выключенном вентиляторе, неправильное подключение к вентиляции, отсутствие грамотной санитарной обработки бокса.

Боксы микробиологической безопасности являются первой ступенью в обеспечении инженерного контроля распространения микроорганизмов различных групп патогенности. И при правильной эксплуатации способны эффективно обеспечивать не только защиту окружающей среды, но и защиту оператора от продуктов, с которыми производится работа. Неправильная эксплуатация, несоблюдение требований нормативных документов потенциально ставят под угрозу безопасность персонала лаборатории.

Опыт работы микробиологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» при проведении массовых мероприятий, в том числе с международным участием

Щербина Л.И.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае», г. Краснодар

В период подготовки и проведения массовых мероприятий, в том числе с международным участием, одной из важных задач является обеспечение биологической безопасности государства. Реализация комплекса мероприятий по обеспечению безопасности и санитарно-эпидемиологического благополучия населения, разработанного службой Роспотребнадзора по Краснодарскому краю, является стратегической задачей.

Микробиологическая лаборатория ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» в практике работы использует принципы надлежащей лабораторной практики, предназначенной для применения при проведении исследования объектов. Цель исследований, проводимых в микробиологической лаборатории, заключается в получении достоверных результатов их безопасности для здоровья людей и/или окружающей среды.

Современное функционирование лабораторной службы для выполнения поставленных задач базировалось на максимальной интеграции диагностических возможностей различных субстанций (иммунохроматографические экспресс-тесты Singlepath и Duopath, стрипы, диагностические тест-планшеты, наборы реагентов для иммуноферментного выявления Ig, антигенов, тест-системы) с использованием ускоренных методов:

- молекулярно-биологический (ПЦР);

- иммуноферментный анализ (ИФА) на полуавтоматическом анализаторе SUNRISE;
- иммуноферментный (МФА);
- иммунофлюоресцентный анализ с использованием анализатора «VIDAS/mini VIDAS»;
- метод разделенного импеданса с использованием автоматизированного экспресс-анализатора «БакТрак 4300».

В связи с поставленными задачами микробиологическая лаборатория несет ответственность за выполнение установленных требований квалификации персонала. Сотрудники, участвующие в выполнении работ по исследованиям (испытаниям), должны иметь компетентность, знания и умения, практические навыки, опыт работы.

Специалисты микробиологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» и его филиалов: 32 врача-бактериолога и 38 фельдшеров-лаборантов прошли подготовку и допуск к работе на приборах по темам:

- «Биологическая безопасность»;
- «Бактериология»;
- «Лабораторная диагностика инфекционных болезней»;
- «Обеспечение биологической безопасности населения»;
- «Метод импеданса при работе на микробиологическом экспресс-анализаторе "БакТрак 4300"»;
- «Иммунофлюоресцентный анализ с использованием анализатора VIDAS/mini VIDAS».

Способ антибактериальной обработки полиуретана медицинского назначения

Якушева Д.Э.¹, Нестерова Л.Ю.², Слободинюк А.И.¹, Касаткин И.А.¹

¹Институт технической химии – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН», г. Пермь;

²Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН», г. Пермь

В настоящее время чрезвычайно актуальной является задача повышения биосовместимости полимерных имплантов и имплантируемых устройств. Для решения этой задачи часто проводят поверхностную модификацию готовых изделий как физическими, так и химическими и комбинированными методами. При этом показатели, характеризующие адгезию бактерий и формирование биопленок на поверхности полученных материалов, должны быть не выше, а желательно ниже, чем у исходных образцов. В настоящей работе были получены образцы модельного полиуретана (ПУ), осуществлена модификация поверхности ПУ образцов, оценена устойчивость к биопрививке.

Для микробиологических исследований изготовили модельный ПУ на основе олигомера марки ПФ-015. Образцы ПУ обрабатывались на ионном имплантере низкоэнергетическими ионами азота в импульсно-периодическом режиме с целью активирования поверхности для дальнейшей химической трансформации. После ионно-лучевой обработки (ИЛО) ПУ образцы подвергали воздействию акриловой кислоты, прививка которой на поверхность за счет двойной связи становится возможной благодаря образовавшимся

радикальным центрам. Дальнейшая химическая модификация диоксиламином и аминoproпанолом в различных органических растворителях приводила к введению в структуру поверхностного слоя алкиламмониевых солей. Исследовались исходный ПУ и 5 вариантов образцов с модифицированной поверхностью.

Для оценки влияния модификации на поведение ПУ материала в бактериальной среде использовали культуры *Staphylococcus epidermidis* ATCC28922 (грамположительная) и *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (грамотрицательная). Сравнительную оценку ростовых характеристик исследуемых культур проводили по оптической плотности (длина волны 600 нм) с использованием мультимодального планшетного ридера TECAN Infinite M200 (Австрия). Массивность биопленки на поверхности модифицированных и контрольных образцов ПУ оценивали по содержанию общего белка в образцах после разрушения клеток ультразвуком и по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) после обработки биопленки ультразвуком (щадящий режим). Наилучшие результаты с точки зрения антибактериальных свойств получены для модифицированного ПУ с молекулами диоксиламмониевой соли акриловой кислоты на поверхности, возможно, за счет появления поверхностного заряда. Некоторое снижение содержания белка и количества КОЕ наблюдается в бактериальной культуре *K. pneumoniae*, однако наибольший эффект достигается в случае *S. epidermidis*. После 48 ч инкубации *S. epidermidis* в динамическом режиме общее содержание белка составляет 66 и 7 мкг/мл, а показатель ln КОЕ составляет 6,77 и 4,70 для контрольного и модифицированного образцов соответственно. В то же время оптическая плотность бактериальной культуры, растущей в присутствии модифицированного образца в течение 48 ч, была ниже по сравнению с контролем (0,59 и 0,9 соответственно). Возможно, это связано с частичным проникновением реагента в питательную среду, этот факт требует дальнейшей проверки и корректировки экспериментальных условий. В дальнейшем планируется тестирование данных образцов на гемосовместимость.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Пермского края (проект РФФИ 17-43-590904p_a).

Апробация иммунохроматографического метода при эпизоотологическом обследовании Сайлюгемского природного очага чумы

Ярыгина М.Б.¹, Балахонов С.В.¹, Рождественский Е.Н.², Уржих Ч.³, Корзун В.М.¹, Денисов А.В.²

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», г. Иркутск;

²ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», г. Горно-Алтайск;

³Центр по изучению зоонозных инфекций Баян-Улгэйского аймака, г. Улгий, Монголия

В последние годы отмечается повышение эпизоотической активности Горно-Алтайского природного очага чумы. Принимая во внимание прогнозируемое обострение эпидеми-

ческой обстановки по чуме в трансграничных очагах, для снижения существующих рисков завоза и распространения чумы на территории Российской Федерации проведено обследование монгольской части Сайлюгемского природного очага чумы.

В условиях ограниченных возможностей лаборатории полевого эпидотряда возрастает значимость экспресс-методов диагностики, которые позволяют оптимизировать объемы бактериологических исследований. На территории Северо-Западной Монголии при эпизоотологическом обследовании с 3 июля по 2 августа 2017 г. проведена апробация иммунохроматографического метода для выявления капсульного антигена (FI) чумного микроба («ИХ тест-система *Yersinia pestis*», ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск).

Объект исследования: добытые грызуны и зайцеобразные (73 экземпляра), трупы млекопитающих (11 экземпляров), свежие остатки стола хищных птиц (16 экземпляров). Из отобранных образцов объектов исследования готовили суспензию органов (печень, селезенка, головной и спинной мозг), 100 мкл которой наносили на диагностические тест-полоски, через 15 мин проводили учет результатов. Получено 8 положительных результатов: 2 – от трупов серых сурков, 1 – от трупа длиннохвостого суслика, 5 – от остатков стола хищных птиц (серые сурки). Данные пробы сразу исследовались бактериологическим методом, при этом через 24–48 ч из них был изолирован возбудитель чумы основного подвида.

Таким образом, применение ИХ-теста для экспресс-диагностики *Y. pestis* в полевом материале при эпизоотологическом обследовании Сайлюгемского природного очага чумы показало высокую информативность. Все положительные результаты, полученные этим методом, были подтверждены выделением чумного микроба. Следует подчеркнуть, что использование ИХ-теста эффективно во время протекания эпизоотии при тестировании материала, содержащего высокую концентрацию возбудителя чумы (погибшие и больные млекопитающие).

О стандартизации процедуры отбора клинического материала при лабораторном исследовании на патогенные вибрионы

Ярымбаш Е.Г., Пидченко Н.Н., Тихонов С.Н., Зинич Л.С.

ФГКУЗ «ПЧС Республики Крым» Роспотребнадзора, г. Симферополь

Необходимость стандартизации лабораторных исследований, в частности при плановых исследованиях на патогенные вибрионы, очевидна. С целью обеспечения стандартизации процесса отбора материала при лабораторном исследовании образцов биоматериала целесообразно использовать готовые стандартные зарегистрированные транспортные среды (например, среда Кэри-Блейра), которые, в отличие от используемой в настоящее время 1% пептонной воды с теллуридом калия, имеют длительный срок хранения (2 года), широкий температурный диапазон хранения

(от +4°C до +25°C), обеспечивают жизнеспособность вибрионов в течение 48 ч), что повышает достоверность диагностического лабораторного исследования.

Для повышения эффективности лабораторного обеспечения медицинской помощи на местах необходимо не только пассивно ждать, чтобы решение проблем пришло откуда-то сверху, а способствовать регламентированию лабораторных процессов путем утверждения и применения стандартных операционных процедур (СОП).

В частности, для улучшения лабораторной диагностики холеры при утверждении СОПов по стандартизации методики отбора клинического материала, целесообразно:

- использовать зарегистрированные транспортные системы, например, Кэри-Блейра (рН 8,4);
- для возможности получения изолированных колоний на щелочном агаре и предотвращения эффекта «роения» сопутствующей микрофлоры, в готовый щелочной агар добавлять 0,1–0,2% вторичных алкилсульфатов натрия (поверхностно-активные вещества, дезоксихолат натрия);
- для обеспечения лабораторной диагностики в выходные и праздничные дни использовать следующие среды накопления: первую среду накопления (50 мл 1% пептонной воды рН 9,3 ± 0,2, термостатирование до 48 ч) и вторую среду накопления (10 мл 1% пептонной воды рН 8,4 ± 0,1, термостатирование до 4 ч).

Изложенные уточнения в виде утвержденных СОПов позволят оптимизировать организацию лабораторных исследований при эпиднадзоре за холерой и повысить достоверность исследования в условиях односменной работы бактериологических лабораторий.

Этиологическая структура возбудителей ИСМП и особенности их антибиотикорезистентности в многопрофильном и специализированном стационарах

Ясная Е.С., Савельев С.И.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Липецкой области», г. Липецк

Проблема инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), считается одной из ведущих в практике стационаров хирургического профиля. По результатам порядка 60 тыс. исследований клинического материала из хирургических отделений многопрофильного и специализированного (онкологического) стационаров, в 87,1% обнаружен рост культур. Этиологическая структура возбудителей гнойно-септических инфекций (ГСИ) у пациентов хирургических отделений различных стационаров была разной. В 62,3% случаев выявлена Грам(+) микрофлора, в 34,0% – Грам(–) микроорганизмы, в 2,8% – грибы рода *Candida*. В монокультуре обнаружено 35,8% бактерий, в ассоциациях – 64,2%. Микробиологический мониторинг в многопрофильном стационаре показал ведущую роль Грам(+) бактерий. Из них на долю стафилококков приходилось 61,3% (*S. aureus* – 51,2%), 48,8% коагулазаотрицательных штам-

мов (*S. epidermidis* – 46%), *S. «viridans» group* – 39%, *S. pyogenes* – 10,5%, *S. agalactiae* – 19%, энтерококков – 22,3%. Удельный вес энтеробактерий составил 71,3%. Из них *E. coli* – 39,2%, *Klebsiella spp.* – 20,4%, *Proteus spp.* – 12,4%; неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФГОБ) – 15,6%, в т.ч. *P. aeruginosa* – 59,8%. В специализированном стационаре определен приоритет Грам(–) микроорганизмов (51,2%). Из них *E. coli* – 30,5%, *Klebsiella spp.* – 23,9%, *P. aeruginosa* – 19,1%. Доля Грам(+) микроорганизмов составила 43,4%, из них стафилококки – 47,6%, энтерококки – 43,3%, стрептококки – 6,4%. Инфицирование грибами рода *Candida* зафиксировано в 3,2% случаев, из них в реанимационных отделениях интенсивной терапии (ОРИТ) – 12%. Доля НФГОБ составила 86,7%, из них *P. aeruginosa* – 72,9%. В многопрофильном стационаре показана высокая чувствительность возбудителей к ципрофлоксацину (89,7%), цефотаксиму (95%) и гентамицину (92%); обнаружены метициллинрезистентные штаммы *S. aureus* (MRSA) 21,4%, *S. epidermidis* (MRSE) 18%. В отношении Грам(–) бактерий чувствительным являлся меропенем (100%), сохранялась чувствительность к цефотаксиму, ципрофлоксацину и гентамицину. 58% культур *P. aeruginosa* показали чувствительность к меропенему и ципрофлоксацину (100%), к цефалоспорином 3-го поколения (42%). В специализированном стационаре 73% штаммов оказались полирезистентными, из них 54,8% *P. aeruginosa*. Выявлено 40% штаммов энтерококков со сниженной чувствительностью к ванкомицину, 53,6% MRSA и 32,4% MRSE.

Таким образом, особенностью ИСМП в хирургических отделениях различных стационаров является полиэтиологичность. Ведущая роль Грам(+) микрофлоры в развитии ГСИ определена в хирургических отделениях многопрофильного стационара, Грам(–) бактерий в специализированном стационаре.

Оценка состояния неспецифической резистентности организма и заболеваемости детского населения в Липецком регионе

Ясная Е.С.¹, Швецова Е.С.², Черняева Е.В.¹, Зубчонок Н.В.¹, Христенко Т.А.¹

¹ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Липецкой области», г. Липецк;

²ГУЗ «Липецкая областная клиническая больница», г. Липецк

Состояние иммунологической реактивности организма признано одним из чувствительных показателей для выявления влияния на человека неблагоприятных экофакторов.

Целью нашей работы явилась оценка иммунного статуса детей, проживающих на территориях с разной степенью антропо-техногенной нагрузки, и установление взаимосвязи показателей заболеваемости и иммунологической реактивности организма.

Исследования проводились с 2009 по 2015 гг. среди детей в возрасте 5–7 лет из организованных коллективов учреждений Липецкой области. В качестве тестов использовались

показатели состояния глубокой микрофлоры кожи, гемолитической и маннитположительной флоры кожи и слизистых носа, бактерицидная активность кожи (БАК). Проведено 9264 исследования, обследовано 3088 детей. Из них проживающих в городах – 1264, в районах области – 1824. Уровень общей заболеваемости был выше среди детей, проживающих в городах, показатель 3796,6 на 100 тыс. населения, среди детей из районов – 1788,0. С кожи предплечья здоровых людей определяется не более 40 колоний микроорганизмов. Частота встречаемости такой нормы у детского контингента из городов и районов оказалась примерно равна и составила 57,2% и 56,3% соответственно. Индексы бактерицидной активности кожи у 96% детей независимо от места проживания находились в пределах нормы. Количество гемолитических штаммов превышало нормативные показатели у 34,6% детей, проживающих в городах, и 44% – в районах. Количество маннитразлагающих штаммов превышало нормативные показатели у 43,7% детей в городах и у 49,8% в районах.

Полученные результаты позволяют предположить взаимосвязь между заболеваемостью и отклонениями в значениях показателей иммунологической реактивности организма. У детского населения городов показатели заболеваемости выше в сочетании со сниженным индексом БАК. Однако показатель, определяющий биоценоз глубокой микрофлоры (увеличение гемолитических и маннитразлагающих штаммов), превышает норму у детей из районов с более низкими показателями первичной заболеваемости, чем у детей в городе. Определение интегральных обобщающих показателей, характеризующих иммунологическую реактивность организма, может представлять интерес при оценке степени вредного воздействия экофакторов (путем дальнейшего динамичного наблюдения) и эффективности проведенных оздоровительных мероприятий.

Количественная ПЦР как метод этиологической диагностики инфекций, вызванных *H. influenzae* и *S. pneumoniae*

Яцышина С.Б., Елькина М.А.

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», г. Москва

S. pneumoniae и *H. influenzae* являются причиной 80% острых средних отитов (ОСО) (Vergison A., 2008), до ¼ (Shinjoh M. et al., 2017) и ½ случаев гнойных менингитов соответственно (Намазова Л.С. и др., 2007). *S. pneumoniae* – основной возбудитель внебольничной пневмонии (30–80% ВП) (Vergison A., 2008), вторым по значимости является *H. influenzae*, включая нетипируемые штаммы (NTHi), которые обнаруживаются в 38% случаях ВП детей (De Schutter I. et al., 2011). Для выявления *H. influenzae* и *S. pneumoniae* используются бактериологические методы, чувствительность которых может значительно снижаться в связи с антибиотикотерапией, неправильным хранением или транспортировкой материала. Большой проблемой в этиологической диагностике является и носительство в верхних дыхательных путях у детей *S. pneumoniae* (до 80%) (Nackers F. et al.,

2017) и *H. influenzae* (до 80%) (Mukundan D. et al., 2017), а также сходство геномов этих бактерий с близкородственными видами. Поэтому экспресс-тест на определение АГ пневмококка в моче рекомендован к применению только у взрослых. Таким образом, имеется необходимость в разработке быстрого, специфического и чувствительного теста, дифференцирующего носительство от инфекции. Перспективным методом является количественная ПЦР-РВ. Локусы Spn9802 (Abdeldaim G. et al., 2010), hpd (Hinz R. et al., 2015) и fucK (Gadsby N. J. et al., 2015) наиболее информативны в определении ДНК *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, тогда как *cpsA* и *bexA* могут «пропускать» бескапсульные бактерии. В ЦНИИЭ был разработан набор реагентов для определения количества ДНК *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, включая бескапсульные, методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией, который можно применять как для стерильных, так и для нестерильных типов биоматериала (ликвор, цельная кровь, мокрота, БАЛ, жидкость из по-

лости среднего уха, мазки со слизистой насо- и ротоглотки, аутопаты). Специфическая активность набора была доказана на 281 образце штаммов и клинических изолятов *H. influenzae* и *S. pneumoniae* различных серотипов, а также на образцах ДНК непатогенных микроорганизмов и возбудителей инфекций дыхательных путей, ОСО и менингита. Неспецифических реакций выявлено не было. Предел аналитической чувствительности для всех типов биоматериала составил – 1×10^3 ГЭ/мл, линейный диапазон измерения – 5×10^3 – 1×10^8 ГЭ/мл ($CV \leq 10\%$). Диагностическая чувствительность и специфичность набора составили 100% (CI 92–100%). С помощью ПЦР *S. pneumoniae* и *H. influenzae* выявлялись в 3 и 10 раз чаще соответственно, чем бактериологическим исследованием жидкости среднего уха больных ОСО (Yatsyshina S. et al., 2016). При тяжелой ВП у взрослых ДНК *S. pneumoniae* обнаруживалась в 2 раза чаще, чем в комбинации бактериологического исследования и экспресс-теста (Рачина С.А. и др., 2017).

НОВОСТИ НАУКИ

Не допускаются никакие системы связи

Clostridium difficile – бактерия, которая может вызвать серьезную диарею путем выработки токсинов. Группа исследователей из Техасского Университета (США) открыла путь, посредством которого гены этой бактерии работают сообща для выработки этих токсинов. По мере того, как *C. difficile* становится все более и более устойчивой к надежным в данный момент антибиотикам, данное открытие может в будущем привести к разработке новых методов лечения инфекций, вызываемых указанным микробом, таким как, например, блокирование совместной работы тех генов и, по этой причине, снижение до нуля способности указанной бактерии продуцировать вызывающие болезнь токсины.

Darkoh C., Odo C., DuPont H.L.

Accessory Gene Regulator-1 Locus Is Essential for Virulence and Pathogenesis of Clostridium difficile.
MBio. 2016; 7(4), e01237-16. doi: 10.1128/mBio.01237-16

Удар по микробам и старости: ученые МГУ открыли новый вид бактерий

Ученые МГУ получили новый штамм бактерий для производства эффективных антибиотиков и консервантов, конкурентоспособных по отношению к импортным. Новый штамм молочнокислых бактерий, продуцирует бактериоцины широкого спектра действия, перспективные для медицины и в сфере питания. Попутно обнаружено, что продолжительность жизни лабораторных мышей, на которых проводили испытания препарата существенно увеличилась. Предполагают, что этот эффект связан с составом культуральной жидкости.

Удар по микробам и старости: ученые МГУ открыли новый вид бактерий [Electronic resource].
URL: <http://ru.b2.mk/news/?newsid=4YCP>

Вспышки редкого заболевания в США

В штатах Висконсин, Мичиган и Иллинойс отмечены вспышки редкого заболевания бактериальной природы. Возбудитель – *Elizabethkingia anopheles* (род *Elizabethkingia* открыт в 2005 г.). С начала наблюдения это крупнейшая эпидемия в стране: десятки инфицированных и более 20 умерших. Группой риска являются люди старше 65 лет с ослабленным иммунитетом. У большинства людей возбудитель был обнаружен в системе кровообращения. Зарегистрировано несколько случаев, когда возбудитель присутствовал в респираторном тракте или в суставах. Исследователям пока не удалось установить источник бактерий, вызвавших эпидемию. Эффективными при лечении инфекции во время вспышки оказались фторхинолоны, рифампин и триметоприм/сульфаметоксазол.

Mysterious Outbreak: 5 Things to Know About Elizabethkingia [Electronic resource].
URL: <http://www.livescience.com/54426-elizabethkingia-outbreak.html> (accessed: 10.10.2016).

ГКПМ-Оболенск



ГКПМ-Оболенск – специализированная коллекция, основными видами деятельности которой являются сбор, хранение и изучение патогенных штаммов бактерий, а также бактериофагов, грибов и клеточных линий.

Коллекция оказывает услуги:

- депонирование (в том числе для целей национальной патентной процедуры) различных микроорганизмов;
- предоставление тестовых штаммов (тест-культур, контрольных штаммов, референс-штаммов, стандартных эталонных штаммов), предназначенных для контроля качества питательных сред;
- идентификация и изучение микроорганизмов.

Руководитель ГКПМ-Оболенск – директор ФБУН ГНЦ ПМБ, академик РАН, д.м.н., профессор Дятлов Иван Алексеевич

Подразделение, ответственное за осуществление деятельности ГКПМ-Оболенск – отдел коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ

Заведующий отделом коллекционных культур – к.б.н. Богун Александр Геннадьевич
Тел.: +7 (4967) 36-00-00

Выдача* типовых (тестовых) штаммов микроорганизмов – Галкина Елена Вячеславовна
Тел.: +7 (4967) 31-21-56

*Для получения штаммов микроорганизмов необходимо подать заявку на бланке организации-заявителя. Заявка должна быть заверена подписью руководителя организации, приобретающей штамм и печатью организации. К заявке необходимо приложить копию лицензии на право работы с патогенными биологическими агентами. Для укоренения процедуры получения штаммов ГКПМ-Оболенск рассматривает факсимильные и электронные копии документов. Заявки необходимо отправлять на факс +7 (4967) 36-00-03 или электронный адрес info@obolensk.org. В заявке желательно указать контактные данные сотрудника, заинтересованного в получении штамма.

п/п	Наименование	Цена
1.	Выдача типовых штаммов микроорганизмов в лиофилизированном состоянии	2500 рублей за ампулу
2.	Депонирование штамма микроорганизма для целей национальной патентной процедуры	бесплатно
3.	Депонирование клеточной линии для целей национальной патентной процедуры	бесплатно
4.	Выдача депозитору образца депонированного штамма	500 рублей
5.	Идентификация микроорганизмов на системе MALDI-Biotyper:	
	1-3 культуры	1000 рублей за культуру
	4-10 культур	750 рублей за культуру
	≥11 культур	500 рублей за культуру
6.	Идентификация микроорганизмов по последовательности 16SrRNA и на системе MALDI-Biotyper:	
	1-3 культуры	7000 рублей за культуру
	4-10 культур	6000 рублей за культуру
	≥11 культур	5000 рублей за культуру
7.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы микроб-автомат	по договоренности
8.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы Biolog	по договоренности
9.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы Vitek	по договоренности
10.	Определение метаболического профиля микроорганизма на системе Biolog	по договоренности
11.	Секвенирование генома микроорганизма на системах MiSeq и/или IonTorrent PGM (работы включают выделение ДНК микроорганизма, приготовление библиотеки, секвенирование, первичный биоинформационный анализ)	от 30 000 рублей за геном
12.	Наработка инактивированной биомассы микроорганизма	по договоренности
13.	Наработка препарата ДНК микроорганизма	по договоренности
14.	Другие исследования	по договоренности



Уважаемые коллеги!

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

приглашает Вас пройти обучение на курсах повышения квалификации

Обучение предусматривает:

- повышение квалификации по микробиологии, биологической безопасности и лабораторной диагностике от 72 до 344 часов;
- профессиональная переподготовка по бактериологии более 500 часов;

Образовательный цикл по программам дополнительного образования включает: лекции, семинары, практические занятия, собеседования, индивидуальные задания, изучение специальной литературы.

Учебно-методическое оснащение учебного процесса обеспечивается наличием методических пособий и рекомендаций по всем разделам подготовки, а также наглядными пособиями, аудио- и видеоматериалами.

Для обеспечения практической и теоретической подготовки предусматривается необходимое количество помещений, оборудованных в соответствии с требованиями биологической безопасности.

Читают лекции и ведут практические занятия ведущие специалисты института, имеющие многолетний опыт научно-практической работы.

По окончании курсов слушателям выдаются соответствующие документы установленного образца (на основании лицензии на осуществление образовательной деятельности в области ДПО №1912 от 4 октября 2011г.).

Контактная информация:

Потапов Василий Дмитриевич - заведующий отделом подготовки и усовершенствования специалистов, д.б.н. тел.: +7 (916) 521-66-53

Кузин Виктор Владимирович – инженер отдела подготовки и усовершенствования специалистов тел.: 7 (4967) 31-21-82

E-mail: kuzin@obolensk.org

Подробная информация

www.obolensk.org Дополнительное профессиональное образование



Правила оформления статей (основные положения)

Журнал «Бактериология» публикуется на русском языке (резюме статей и ключевые слова – на русском и английском языках), распространяется на бумажном носителе и публикуется в электронной форме.

К публикации принимаются экспериментальные и обзорные статьи, а также короткие сообщения по прикладным и фундаментальным вопросам медицинской, ветеринарной и сельскохозяйственной бактериологии. Статьи принимаются без ограничения объема от граждан любой страны на русском языке. По согласованию с редакцией допускается публикация рекламных материалов, соответствующих тематике журнала.

Публикации, созданные в порядке выполнения служебного задания, должны иметь направление от учреждения, в котором выполнена работа. В направлении следует указать, что представленный материал ранее не был нигде опубликован и не находится на рассмотрении для публикации в других изданиях (включая зарубежные).

К публикации прилагается экспертное заключение организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов.

Материалы для публикации, включая сопровождающие документы, направляются в редакцию в электронной форме по адресу: info@obolensk.org или bacteriology@obolensk.org. В теме сообщения следует указать «Бактериология».

Требования к оформлению статьи.

Экспериментальная статья должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторах на русском и английском языках с указанием адреса, контактных телефонов (служебного и мобильного), факса и электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

Текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок – отдельным файлом.

РЕЗЮМЕ статьи должно быть представлено на русском и английском языках, отражать основные полученные результаты и содержать не более 250 слов.

КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (словосочетаний) должно быть не более 10, на русском и английском языках.

Во ВВЕДЕНИИ (без заголовка) следует изложить мотивацию написания данной работы и отдельным абзацем обозначить цель исследования. Дополнительно на английском языке.

Раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ должен содержать сведения об объекте исследования (включая источник получения, название коллекции) и краткое описание использованных методик, позволяющее их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала в кавычках и страны в скобках.

Следует использовать общепринятые современные сокращения мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. Единицы измерения должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная). Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов следует приводить в соответствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используются строчные буквы (курсив).

Рисунки и таблицы размещаются в тексте статьи в соответствии с пожеланиями авторов. Кроме того, черно-белые и цветные рисунки (в формате *.jpg) прилагаются к статье в виде отдельных файлов (ris1.jpg, ris2.jpg и т.д.)

Сведения о финансовой поддержке работы приводятся в конце текста статьи перед списком литературы.

В СПИСКЕ ЛИТЕРАТУРЫ указываются авторы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для названия журналов используются общепринятые сокращения (<http://www.nlm.nih.gov/>).

В случае невыполнения настоящих правил оформления статья не принимается и отсылается авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:

142279, Московская обл.,

Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ

Тел. (4967) 36-00-46

Факс (4967) 36-00-10

E-mail: info@obolensk.org

или

bacteriology@obolensk.org