

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2017 • ТОМ 2 • №4

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

Колонка главного редактора

Возможности использования CRISPR-Cas-системы для диагностических целей в медицинской микробиологии <i>И.А.Дятлов</i>	5
Остров «высокой патогенности»: продукция металлофора йерсениобактина, интегративность, мобильность <i>А.Ракин</i>	7
Свойства бактерий <i>F. tularensis subsp. holarctica</i> , лишенных способности синтезировать белок igIC <i>А.Н.Мокриевич, В.М.Павлов, Г.М.Вахрамеева, Р.И.Миронова, Т.И.Комбарова, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, И.А.Дятлов</i>	17
Влияние генетической характеристики <i>Helicobacter pylori</i> на воспалительный процесс в слизистой оболочке верхних отделов пищеварительного тракта детей с хроническим гастритом <i>Е.М.Спивак, Р.М.Левит, Г.В.Кузьмина, М.Ю.Деменчук</i>	25
Фрагменты генов «островов» патогенности <i>Escherichia coli</i> у клинических штаммов условно-патогенных представителей <i>Enterobacteriaceae</i> и клинико-лабораторные особенности острых кишечных инфекций <i>Р.Т.Мурзабаева, А.Р.Мавзютов, Д.Н.Дубровская</i>	30
Использование рекомбинантного слитного белка тимозин альфа-фактор некроза опухолей-тимозин альфа человека для получения гибридом к тимозину альфа <i>С.С.Ветчинин, Е.В.Галкина</i>	36
Частота встречаемости и количественное содержание основных пародонтопатогенов при пародонтитах различной степени тяжести <i>К.Ю.Швец, Э.Р.Тамарова, А.Р.Мавзютов, А.И.Булгакова</i>	40
Электрооптический анализ как средство контроля за внешними воздействиями на клетки бактерий <i>А.Г.Волошин, В.Д.Бунин, В.В.Веревкин, С.Г.Игнатов</i>	46
Микробиологическая оценка фторхинолонов II и III поколений для профилактики и лечения инфекционных осложнений хирургических операций <i>А.О.Зуева, В.И.Чувилкин, М.С.Подпорин, А.А.Лабазанов, А.М.Панин, В.Н.Царёв</i>	50
Анализ микробиологического разнообразия криосферы на примере мерзлых грунтов Мамонтовой горы <i>Г.М.Едидин, А.В.Брушков, Е.А.Денисенко, В.В.Веревкин, С.Н.Вирысов, С.Г.Игнатов</i>	55

Тезисы докладов III Национального конгресса бактериологов (дополнение)

В рамках XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНОЭМП). Москва, 16–17 ноября 2017 г.	60
--	----

Официальная информация

Резолюция XI Всероссийского съезда Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» (Москва, 16–17 ноября 2017 г.)	62
Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 №1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации»	66
Информационное письмо №1. Форум университетской науки – 2018. «Научное медицинское прогнозирование: молекулярно-генетические аспекты, триггеры патогенеза, ятрогенные влияния». 15 мая 2018 года, г. Москва	72

Памяти коллеги

Николай Николаевич Ураков	76
Дмитрий Владимирович Виноградов–Волжинский	77
Клец Элиазар Исаакович (к 120-летию со дня рождения)	78
Правила для авторов	80

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

Editor-in-Chief's Introduction

Possibilities of using the CRISPR-Cas system for diagnostics in medical Microbiology <i>I.A.Dyatlov</i>	5
«High pathogenicity» island: yersiniabactin metallophore production, integration, mobility <i>A.Rakin</i>	7
Properties of <i>F. tularensis subsp. holarctica</i> bacteria deprived the ability to synthesize iglC protein <i>A.N.Mokrievich, V.M.Pavlov, G.M.Vakhrameeva, R.I.Mironova, T.I.Kombarova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, I.A.Dyatlov</i>	17
The influence of genetic features of <i>Helicobacter pylori</i> on the inflammatory process in the mucosa of the upper digestive tract of children with chronic gastritis <i>E.M.Spivak, R.M.Levit, G.V.Kuzmina, M.Yu.Demenchuk</i>	25
Fragments of pathogenicity islands genes of <i>Escherichia coli</i> of in clinical strains of opportunistic <i>Enterobacteriaceae</i> and clinical and laboratory features of acute intestinal infections <i>R.T.Murzabaeva, A.R.Mavzyutov, D.N.Dubrovskaya</i>	30
Use of recombinant fuse protein tyrosine alpha-tumor necrosis factor alpha-human alpha thymosin to obtain hybridoma cells to tyrosine alpha <i>S.S.Vetchinin, E.V.Galkina</i>	36
Frequency of occurrence and quantitative content of main parodontopathogenes at parodontitis of different degree of gravity <i>K.Yu.Shvets, E.R.Tamarova, A.R.Mavzyutov, A.I.Bulgakova</i>	40
Electro-optical analysis as a means to control external impacts on bacterial cells <i>A.G.Voloshin, V.D.Bunin, V.V.Verevkin, S.G.Ignatov</i>	46
Microbiological evaluation of II and III generation quinolones in prevention and treatment of inflammatory complication in oral surgery <i>A.O.Zueva, V.I.Chuvilkin, M.S.Podporin, A.A.Labazanov, A.M.Panin, V.N.Tsarev</i>	50
Analysis of microbial diversity in the cryosphere with permafrost samples from Mount Mammoth area as an example <i>G.M.Edinin, A.V.Brushkov, E.A.Denisenko, V.V.Verevkin, S.N.Viryasov, S.G.Ignatov</i>	55

Abstracts of the III National Congress of Bacteriologists (supplement)

Within the framework of the 11 th Congress of the All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists. Moscow, 16–17 November 2017	60
--	----

Official Information

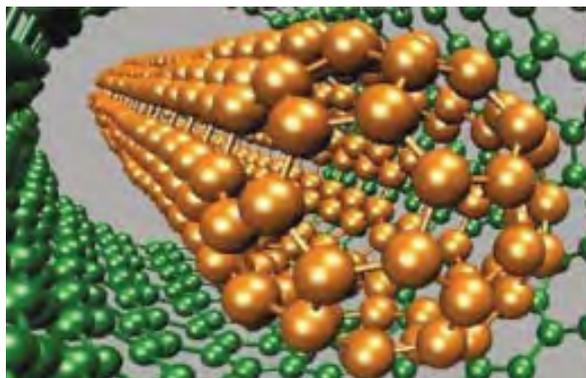
Resolution XI all-Russian Congress Russian "All-Russian Scientific and Practical Society Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists» (November 16–17, 2017, Moscow)	62
Rospotrebnadzor Order No. 1116 of 01.12.2017 "About Improving the Monitoring System, Laboratory Diagnostics of Infectious and Parasitic Diseases, and BHA Indication Procedures in the Russian Federation»	66
Curcular No. 1. University Science Forum – 2018. «Scientific Medical Forecast: Molecular and Genetic Aspects, Pathogenesis Triggers, Iatrogenic Effects». May 15, 2018, Moscow	72

Obituary

Nikolai Nikolaevich Urakov	76
Dmitrii Vladimirovich Vinogradov–Volzhinskii	77
Eliazar Isaakovich Klets	78
Instructions for Authors	80

Возможности использования CRISPR-Cas-системы для диагностических целей в медицинской микробиологии

С RISPR-система (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) представляет собой локусы бактерий и архей, состоящие из прямых повторяющихся последовательностей, которые разделены уникальными по своей структуре спейсерами. Cas-белки (CRISPR-associated sequence) представляют собой нуклеазы, которые после распознавания разрезают вирусную ДНК и уничтожают ее, защищая клетку от инфекции. Таким образом, эта система представляет собой механизм адаптивного иммунитета бактериальной клетки, защищая ее от воздействия вируса бактерии – бактериофага. В последние годы было выяснено, что CRISPR-Cas-система может быть использована в генной инженерии для тонкого направленного редактирования геномов бактерий и даже эукариот.



Данная технология развивается достаточно эффективно в отношении создания средств лечения некоторых болезней, несмотря на ряд трудностей, связанных с возникновением непредвиденных мутаций. При углубленных исследованиях в области применения CRISPR-Cas-системы было выяснено, что она может быть использована для тонких диагностических процедур при выявлении опасных для человека вирусов и бактерий, а также их генотипирования.

В результате ряда исследовательских работ была предложена новая диагностическая система под названием SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing – Специфичное ВысокоЧувствительное Ферментативное Репортерное Разблокирование), представляющая собой платформу для *in vitro* детекции нуклеиновых кислот с аттомольной (10^{-18} моль/л) чувствительностью, основанную на амплификации нуклеиновой кислоты и Cas13a-опосредованном расщеплении репортерной РНК (A.East-Seletsky et al. Nature 2016;538:270–273). Использование этого механизма позволило проводить выявление мишени в режиме реального времени. Принцип работы системы SHERLOCK заключается в том, что нуклеиновые кислоты из пробы переводят в ДНК, синтезируют на ее основе РНК с помощью T7-полимеразы, определяют в полученной библиотеке нужные последовательности с помощью нуклеазы Cas13a/C2c2, и она же уничтожает все подходящие по последовательности молекулы. При этом разрушение РНК приводит к флюоресценции. Реакция может проводиться при изотермическом режиме.

Исследована возможность использования SHERLOCK для эффективного выявления вирусов при инфекционных заболеваниях, требующих высокой чувствительности. Так, удалось выявить различия между флавовирусами Зика и Денги (J.S.Gootenberg et al. Science. 2017 Apr 28; 356(6336): 438-442. doi: 10.1126/science.aam9321), что имеет существенное эпидемиологическое значение. SHERLOCK также способна к детекции вируса Зика в клинических образцах (сыворотка, моча или слюна), где титры могут достигать очень низких значений, а именно 2×10^3 копий/мл (3,2 аМ).

Другим важным эпидемиологическим приложением для CRISPR является идентификация бактериальных патогенов и детекция специфических бактериальных генов. На примере *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* с помощью SHERLOCK удалось корректно генотипировать ряд штаммов при низкой перекрестной реактивности. Кроме того, платформа SHERLOCK использована для дифференциации клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с двумя различными генами устойчивости – к карбапенемазе и NDM-1-металло-бета-лактамазе, что открывает значительные перс-

пективы для создания мультиплексных систем для одновременной идентификации бактерий и выявления у них генов антибиотикорезистентности.

При исследовании возможности использования SHERLOCK в полевых условиях в виде лиофилизированных пятен на бумаге было показано, что комплексы Cas13a-crPHK после лиофилизации и регидратации сохраняли способность детектировать PHK, при этом выявление мишени также было возможно на стекловолкне. Другие компоненты SHERLOCK также хорошо переносят лиофилизацию, и компоненты реакции Cas13a на бумаге показывают результаты детекции, сравнимые по уровню чувствительности с растворенными в воде компонентами.

Исследователи, работающие в данной области, считают, что платформа SHERLOCK перспективна для дальнейших применений, включая количественное определение PHK/ДНК вместо специфических ПЦР-анализов, быструю мультиплексную детекцию экспрессии PHK, другие виды чувствительной детекции, например, выявление загрязнения образцов нуклеиновыми кислотами.

В перспективе Cas13a может детектировать транскрипты в пределах биологических систем и отслеживать транскрипты с аллелеспецифической экспрессией или связанными с болезнью мутациями в живых клетках. SHERLOCK – это многофункциональный, ошибкоустойчивый метод детекции PHK и ДНК, пригодный для быстрой постановки диагнозов, включая инфекционные заболевания и сенситивное генотипирование.

Однако при анализе публикаций по данному вопросу следует констатировать, что на современном этапе развития метода SHERLOCK не выявляется достаточно четких преимуществ для детекции патогенов по чувствительности в сравнении с ПЦР-анализом, широко используемым для данных целей, несмотря на существенно более высокую специфичность реакции и меньшую вариабельность. Кроме того, постановка метода в данном варианте требует очень высокой чистоты реагентов и окружающего пространства в связи с возможным перекрестным загрязнением гетерогенными нуклеазами, существенно искажающими результаты исследования. Исследования в области развития данной платформы для диагностических целей находятся на раннем этапе развития и носят в основном феноменологический характер, хотя нет сомнения, что технология на основе платформы SHERLOCK найдет свое достойное место в детекции биологических молекул и существенно повысит ее эффективность в целом ряде областей применения.

И.А.Дятлов

*Директор ФБУН «Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор*

Остров «высокой патогенности»: продукция металлофора йерсиниобактина, интегративность, мобильность

А.Ракин

Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Jena, Germany

Обзор посвящен организации, функции и подвижности генетического мобильного элемента – острова «высокой патогенности» (HPI). Первоначально обнаруженный у представителей рода *Yersinia*, у которых он отвечал за захват ионов железа и способность убивать мышей в низких инфекционных дозах, HPI позже был выявлен у многочисленных представителей *Enterobacteriaceae*, у которых он играл роль в поддержании бактериального гомеостаза. Остров отвечает за продукцию металлофора йерсиниобактина, участвующего в доставке в клетку ионов ряда металлов. Широкое распространение острова объясняется его способностью коинтегрироваться с трансмиссивными плазмидами. Резюмируя, остров патогенности представляет собой архетип мобильного элемента, распространенного у бактерий благодаря его роли в фитнесе и мобильности.

Ключевые слова: острова патогенности, *Yersinia*, йерсиниобактин, интегративность, мобильность

Для цитирования: Ракин А. Остров «высокой патогенности»: продукция металлофора йерсиниобактина, интегративность, мобильность. Бактериология. 2017; 2(4): 7–16 DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-7-16

«High pathogenicity» island: yersiniabactin metallophore production, integration, mobility

A.Rakin

Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Jena, Germany

The review summarizes data on genetic organization, function and mobility of the genetic mobile element – the High Pathogenicity Island (HPI). Originally, HPI was found in *Yersinia* and was associated with iron acquisition and ability to kill mice in low infection doses (High Pathogenicity phenotype). However, the genetic element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* and plays an important role in bacterial fitness. The encoded metallophore, yersiniabactin, is responsible for its role being implicated in the uptake of important metal ions. The mobility of the HPI can be explained by its ability to cointegrate with transmissible plasmids. Taken together, HPI represents an archetype mobile functional element widely disseminated in bacteria due to its fitness and mobility potential.

Keywords: pathogenicity islands, *Yersinia*, yersiniabactin, integration, mobility

For citation: Rakin A. «High pathogenicity» island: yersiniabactin metallophore production, integration, mobility. Bacteriology. 2017; 2(4): 7–16. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-7-16

Бактериальные геномы мозаичны по своей природе и состоят из консервативного «ядра», ответственного за проявления жизненно важных функций, и «гибкого» геномного «резерва», функции которого реализуются лишь в определенных условиях. Этот дополнительный резерв представлен мобильными генетическими элементами различной природы: профагами, плазмидами, транспозонами и геномными островами, к которым относятся и так называемые острова патогенности (ОП).

Происхождение названия «остров высокой патогенности» исторически связано с «высокой» вирулентностью штаммов *Yersinia enterocolitica* биотипа 1В для мышей. Штаммы этого

биотипа, или подвида *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* [1], способны убивать мышей в малых дозах, в то время как штаммы биотипов 2, 3 и 4, или *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleoartica*, мышей в малых дозах не убивают. Структурой, ответственной за «высокую вирулентность», оказалась система активного захвата ионов железа, представленная металлофором йерсиниобактином [2]. Гены синтеза, транспорта и регуляции йерсиниобактина расположены на генетически мобильной структуре, полностью подходящей под определение «геномного острова», или «острова патогенности». Под островами патогенности (pathogenicity island, PAI) обычно подразумевают мобильные генетические

Для корреспонденции:

Ракин Александр, кандидат биологических наук, руководитель группы, Институт Фридриха Леффлера, Национальный институт здоровья животных
Адрес: 07743 Йена, Германия, ул. Наумбургер, 96а
E-mail: rakin@gmx.de

Статья поступила 12.10.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Alexander Rakin, PhD, Group Leader Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health
Address: Naumburger Str. 96a, 07743 Jena, Germany
E-mail: rakin@gmx.de

The article was received 12.10.2017, accepted for publication 22.12.2017

элементы, которые, как правило, присутствуют у вирулентных бактериальных штаммов и отсутствуют у их авирулентных родственников [3]. Активные в генетическом отношении острова патогенности содержат систему рекомбинационных ферментов и участки узнавания, отвечающие за взаимодействие с мишенями на геноме хозяйской клетки. Острова в большинстве случаев имеют ГЦ-состав, отличный от ГЦ-состава хозяйской клетки, и чаще всего ассоциированы с генами, кодирующими транспортные или иные малые РНК [4]. Впоследствии было показано, что, кроме *Y. enterocolitica* subsp. *Enterocolitica*, остров высокой патогенности (high-pathogenicity island, HPI) присутствует также у всех вирулентных штаммов *Yersinia pestis* и штаммов 1 серовара *Yersinia pseudotuberculosis* [5, 6]. Кроме штаммов 1 серовара, укороченный вариант острова обнаружен у приблизительно 50% штаммов *Y. pseudotuberculosis* серовара O:3 [7–9]. Однако штаммы этой группы обладают пониженной вирулентностью по сравнению с остальными штаммами серовара O:3 и содержат альтернативную систему утилизации ионов железа [10].

Общая характеристика острова высокой патогенности

HPI уникален среди геномных островов в том смысле, что он широко распространен среди представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Первоначальные воззрения о наличии HPI только у высокопатогенных йерсиний и некоторых патогенных представителей кишечной палочки [8, 11] привели к тому, что HPI часто именовали островом высокой патогенности йерсиний. Однако дальнейшие целенаправленные поиски HPI у *Enterobacteriaceae* значительно расширили число

хозяев острова. Кроме упомянутых *Yersinia spp.* и *Escherichia coli* ExPEC, HPI удалось обнаружить у *E. coli* UPEC, EHEC, APEC, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella enterica* Subspecies I и *Salmonella* Biogroup IV [11–16]. Это свидетельствует не только о широком распространении HPI, но и, по-видимому, о явных эволюционных преимуществах, придаваемых хозяйской бактериальной клетке приобретением системы активного захвата железа, кодируемой островом. С другой стороны, остров отсутствует у представителей энтерогеморрагических *E. coli* и *Shigella spp.* [13], что, скорее, подразумевает сложный характер взаимоотношения островных генов с хозяйским геномом.

Организация острова патогенности

Остров высокой патогенности структурно может быть разделен на две части (рис. 1): функциональную, ответственную за синтез йерсениобактина и его генетическую активность, и АТ-богатую вариабельную, которая отличается у представителей двух генетических линий, *Yersinia pestis* и *Y. enterocolitica* [17].

Функциональная часть острова содержит гены, участвующие в синтезе, транспорте и регуляции синтеза йерсениобактина (таблица). Первоначально было установлено, что этот сидорофор активно участвует в захвате молекул железа, что необходимо для обеспечения полноценного размножения патогена в условиях дефицита ионов железа, который создается в тканях животных как один из факторов защиты от инфекции. Показано, что бактериальные клетки, содержащие последовательности HPI, секретируют низкомолекулярный сидорофор йерсениобактин [2, 18]. Йерсениобактин содержит в своей структуре фенольное, тиазолиновое и тиа-

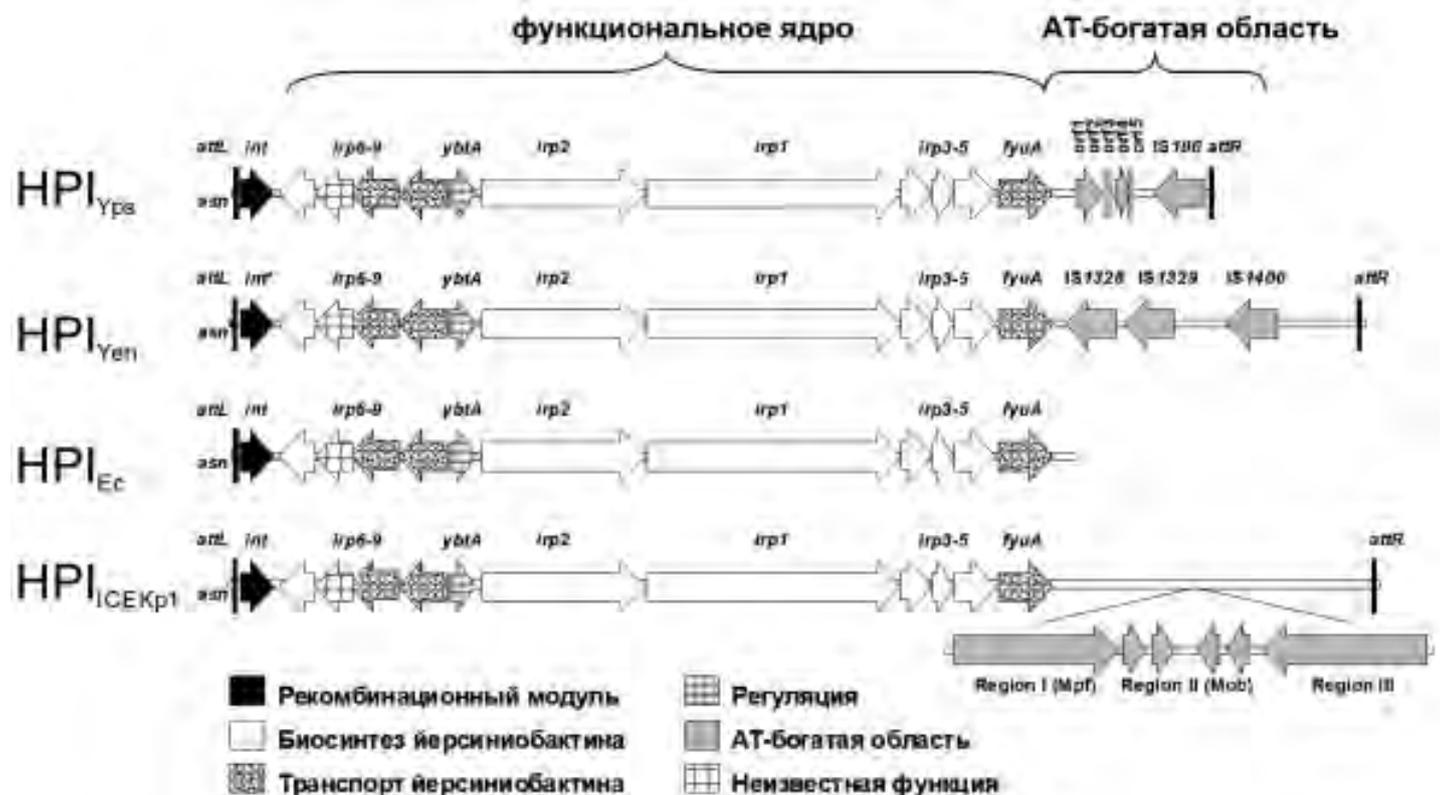


Рис. 1. Организация острова патогенности HPI у представителей различных эволюционных линий.

Таблица. Гены, участвующие в синтезе, транспорте и регуляции синтеза йерсениобактина

Ген	Название	Функция
YPO1916	<i>ybtS</i>	салицилатсинтаза
YPO1915	<i>ybtX</i>	возможное участие в передаче сигнала
YPO1914	<i>ybtQ</i>	АВС-транспортёр внутренней мембраны
YPO1913	<i>ybtP</i>	липопротеин, АВС-транспортёр внутренней мембраны
YPO1912	<i>ybtA</i>	транскрипционный регулятор
YPO1911	<i>irp2</i>	биосинтез йерсениобактина
YPO1910	<i>irp1</i>	поликетидсинтаза, биосинтез йерсениобактина
YPO1909	<i>ybtU</i>	оксидоредуктаза, биосинтез йерсениобактина
YPO1908	<i>ybtT</i>	тиоэстераза, биосинтез йерсениобактина
YPO1907	<i>ybtE</i>	биосинтез йерсениобактина
YPO1906	<i>fyuA</i>	рецептор пестицина и йерсениобактина

золидиновые кольца (рис. 2) и обладает высоким сходством с сидерофорами пиохелином, продуцируемым *Pseudomonas aeruginosa* [19], и ангвибактином *Vibrio anguillarum* [20]. Однако впоследствии было установлено наличие дополнительных активностей этого металлофора. Так, было показано участие йерсениобактина совместно с ZnuABC-системой в захвате и транспорте ионов цинка [21, 23]. Металлофор йерсениобактин оказался также способным защищать уропатогенные *Escherichia coli*, связывая токсичные ионы меди и сохраняя при этом ее биологическую доступность (nutritional passivation) [23]. В дополнение к способности связывать ионы железа и меди, йерсениобактин образовывал ионные комплексы с галлием, никелем, кобальтом и хромом [24]. В целом же металлофор продемонстрировал связывающую активность в отношении 10 металлов в следующем порядке $Fe^{3+} > Ga^{3+} > Ni^{2+} > Cu^{2+} > Cr^{2+} \approx Zn^{2+} > Co^{2+} > Pd^{2+} > Mg^{2+} > Al^{3+}$,

что позволяет предполагать возможность использования его для очистки воды [25].

Подавляющее большинство генов, участвующих в продукции йерсениобактина, кластеровано в пределах функционального Ybt ядра острова (см. рис. 1) [6, 26–28]. Шесть генов, обозначенных как *irp1–irp5* и *irp9* в *Y. enterocolitica* и *irp1, irp2, ybtU, T, E, S* в *Y. pestis* и *Y. Pseudotuberculosis*, отвечают за биосинтез йерсениобактина. Белковый продукт гена *fyuA* (Psn, или *pesticin* receptor precursor (IRPC)) является одновременно рецептором бактериоцина пестицина и сидерофора йерсениобактина. Этот белок (73,782 кДа) располагается во внешней мембране и относится к семейству TonB-зависимых рецепторов [29]. Продукция белка FyuA активируется при снижении концентрации железа и находится под контролем глобального регулятора железа, белка Fur [30, 31]. Irp6 и Irp7 (YbtQ и YbtP в *Y. pestis*) участвуют в транспорте йерсениобактина через цитоплазматическую мембрану бактериальной клетки [32, 33]. До сих пор не идентифицирован периплазматический компонент, участвующий в транспорте йерсениобактина, который, по-видимому, не кластерован с остальными генами продукции йерсениобактина. Экспрессия биосинтетических и транспортных генов контролируется содержанием железа и белком Fur и активируется на уровне транскрипции AraC-подобным транскрипционным регулятором YbtA, который подавляет также и собственную транскрипцию [34–36]. Функция продукта YbtX (Irp8 в *Y. enterocolitica*) критична для функционирования дополнительной системы транспорта цинка в дополнение к основной ZnuABC системе [21].

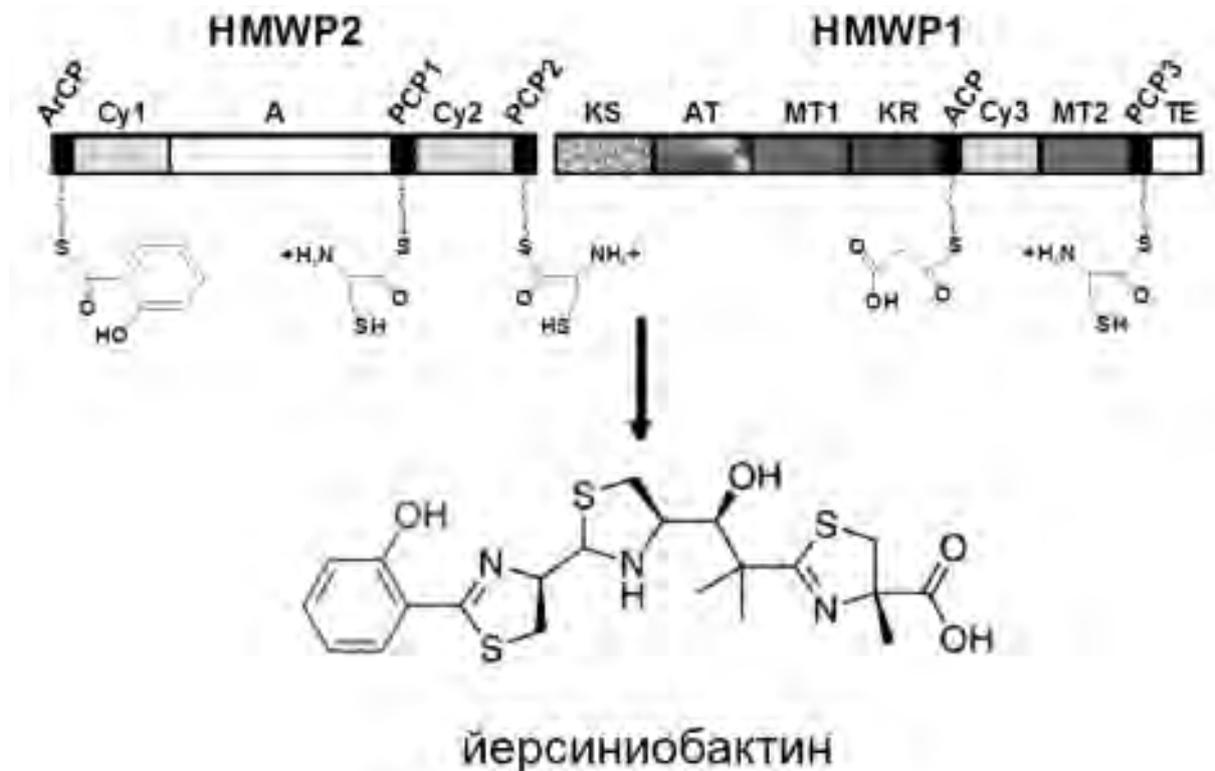


Рис. 2. Биосинтез йерсениобактина. На HMWP1 и HMWP2 показаны сайты связывания с салицилатом, малонатом и тремя молекулами цистеина. Изображены следующие каталитические домены: ArCP – арилсвязывающий домен; ACP – ацилсвязывающий домен; Cy – домен, ответственный за конденсацию/циклизацию; A – домен, ответственный за аденилирование; PCP – пептидилсвязывающий домен; KS – кетоацилсинтазный домен; AT – ацилтрансферазный домен; MT – метилтрансферазный домен; KR – бета-кеторедуктазный домен; TE – тиоэстеразный домен.

Йерсениобактин синтезируется по смешанной стратегии не-рибосомального пептидного (NRPS)/поликетидного (PK) синтеза (см. рис. 2), который сводится к модульной сборке сидерофора из салицилата, группы малонил коэнзима А, трех молекул цистеина и трех метильных групп [26]. *Irp9* (*YbtS*) является первым геном в кластере, ответственном за продукцию йерсениобактина (см. рис. 1, таблица). Он напрямую конвертирует хоризмат в салицилат, который служит предшественником йерсениобактина [37]. В этом отношении йерсинии отличаются от псевдомонад, у которых в синтезе салицилата участвуют как минимум два фермента – изохоризматсинтетаза и изохоризмат-пируват-лиаза. Кстати, оба эти фермента требуются для комплементации *irp9* мутанта у *Yersinia spp.* [37]. *Irp5* (*YbtE*) салицил-АМФ-лигаза переносит активированный салицилат к высокомолекулярному белку HMWP2 (он кодируется геном *irp2*). HMWP2 обладает шестью потенциальными NRPS доменами, участвующими в реакциях первоначальной циклизации и конденсации. *Irp3* (*YbtU*) редуцирует внутреннее тиазолиновое кольцо в тиазолидиновое, в то время как первые пять доменов HMWP1 (который кодируется геном *irp1*) переключаются с линейной сборки сидерофора по NRPS-типу на поликетидный. *Irp4* (*YbtT*) несет тиазоластеразный домен, позволяющий удалять aberrantные структуры из энзиматического комплекса и, кроме того, обладает функцией редактирования, в которой он участвует совместно с терминальными доменами HMWP1. Обычно NRPS/PK синтетазы активируются фосфопантетилированием. Однако соответствующая P-panT трансфераза, *YbtD*, необходимая для функционирования системы синтеза йерсениобактина, была обнаружена вне острова высокой патогенности [38]. Такая организация генов накладывает дополнительные требования на хозяйскую клетку таким образом, что продукция йерсениобактина, кодируемая генами острова, оказывается тесно связанной с биохимией клетки хозяина.

Продукция *Ybt* кластером острова высокой патогенности секретлируемого метаболита, обозначенного как «эшерихелин», отсутствующего у делеционного *ybtS* мутанта и ингибирующего пиохелиновую систему у *Pseudomonas aeruginosa* [39], свидетельствует не только о новых свойствах этого генного кластера, но и о необходимости применения новых подходов к оценке взаимовлияния металлофорных систем в бактериальной клетке.

Две генетические линии НРІ

Сравнение организации островов позволило выделить две генетические линии НРІ, одну у *Y. pestis*/*Y. pseudotuberculosis* (*Yps* НРІ), которая широко распространена у представителей семейства *Enterobacteriaceae*, включая и упомянутые выше *E. coli*, и вторую – у *Y. enterocolitica* (*Yen* НРІ), распространение которой ограничивается только штаммами *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* сероваров O:8, O:13, O:20 и O:21 (см. рис. 1) [8]. Размер острова различен у организмов этих двух групп и составляет 43153 п.о. для *Yen* НРІ и 36378 п.о. для *Yps* НРІ. Размер острова в интегрированном состоянии определяется размером нуклеотидной последовательности, ограниченной двумя короткими прямыми повторами по 18 п.о., представляющими центральную (корковую) часть «O» гибридных *attL* и *attR* сайтов рекомбинации.

Последние образованы в результате сайт-специфической рекомбинации *attP* сайта острова высокой патогенности с бактериальным *attB* сайтом, который в случае НРІ представлен *asn tDNA* геном [7, 40]. Различия, наблюдаемые в размерах НРІ, обусловлены наличием вариативной АТ-богатой части, которая полностью отличается у островов двух генетических линий. Приобретение многочисленных мобильных IS-элементов и приводит к увеличению общего размера островов у штаммов *Y. enterocolitica* [17, 41].

Yp НРІ часто претерпевает протяженные делеции вариативной части, что может, в свою очередь, сопровождаться утратой рекомбинационного *attR* сайта (например, в случае *E. coli*) (см. рис. 1) [42] и приводит к иммобилизации острова. Следует отметить, что *Yen* НРІ «заморожен» в одном единственном локусе на хромосоме *Y. enterocolitica* благодаря точечной мутации в гене, кодирующем рекомбиназу, ответственную за генетические перемещения НРІ [17, 41]. Однако и в *Y. pseudotuberculosis* O:3 большая часть генов в АТ-богатой части *Yps* НРІ, включая ген рецептора йерсениобактина, делетирована, что привело к неспособности штаммов этой группы продуцировать йерсениобактин [7, 8]. Роль укороченного варианта острова в *Y. pseudotuberculosis* O:3 до сих пор неясна. Высокая степень сохранения нуклеотидных последовательностей свидетельствует либо о сравнительно недавней в эволюционном плане делеции, либо о выполнении каких-либо дополнительных функций промежуточными продуктами сидерофора, способность к синтезу которых может сохранить укороченный вариант острова.

По-видимому, остров высокой патогенности линии *Yps* НРІ может быть принят за архетип острова, учитывая тот факт, что именно этот вариант содержит наиболее полный набор генов, необходимых для его генетической подвижности и полноценной продукции йерсениобактина.

«Вторая копия» острова высокой патогенности, НРІ-2

Определение полной нуклеотидной последовательности генома чумного микроба [43] продемонстрировало наличие кластера генов [YPO0770-YPO0778], которые обладали гомологией с генами НРІ. Эту область стали в дальнейшем обозначать как вторую копию НРІ, или НРІ-2 (рис. 3). Позднее этот кластер, содержащий гены, способные к нерибосомальному синтезу пептидов, был обозначен как *ypn*, *Yersinia non-ribosomal peptide* [44, 45].

В действительности же «вторая копия» НРІ таковой не является и только частично содержит нуклеотидные последовательности, имеющие гомологию с последовательностями, представленными на основной функциональной копии острова. Более того, гены НРІ-2 показывают более высокое сходство с генами биосинтеза сидерофора пиохелина у псевдомонад. Так, продукт гена YPO0776 по аминокислотному составу схож с *Irp2* на 31%, тогда как его гомология с белком PchF *P. aeruginosa* составляет 34%. НРІ-2 лишен рекомбиназы, которая отвечала бы за его интеграцию в геном хозяйской клетки, а также сайтов рекомбинации, необходимых для осуществления сайтспецифической рекомбинации. Кроме того, НРІ-2 расположен в области хромосомы, не содержащей генов, кодирующих аспарагиновую тРНК, а следовательно, неясен и возможный механизм его интеграции в хозяйскую ДНК. Благодаря наличию вставочной последо-

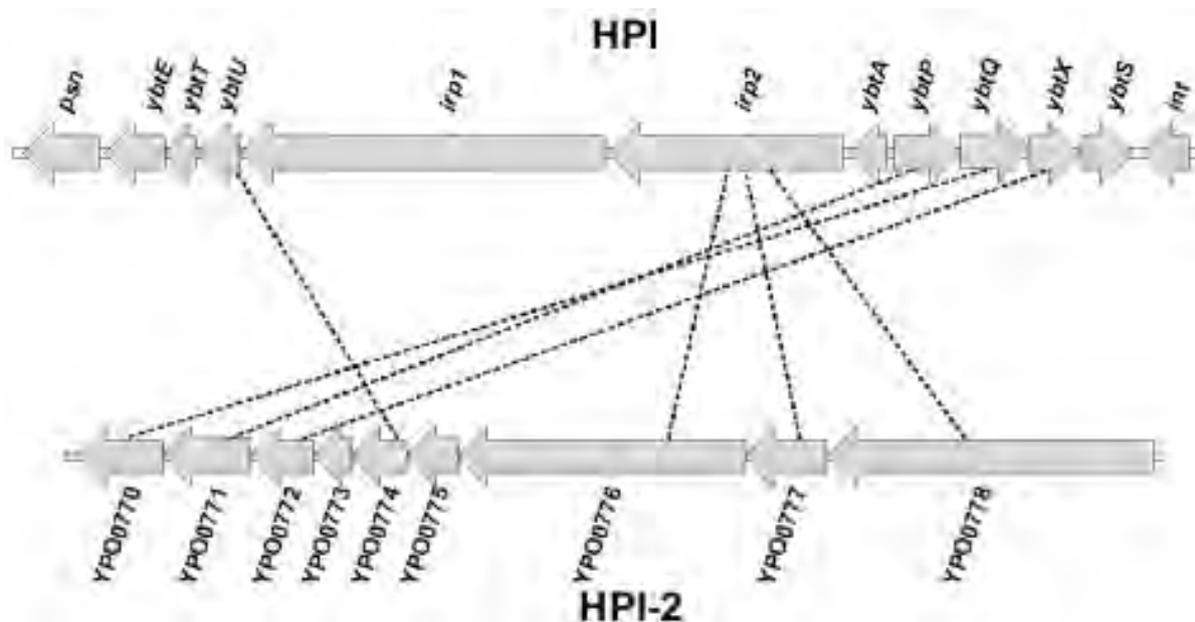


Рис. 3. Сравнение генетической организации HPI и HPI-2. Гены, продемонстрировавшие гомологию (порядка 27–45%), соединены пунктирными линиями.

вательности IS21 (YPO0780 в геноме *Y. pestis* CO92) в непосредственной близости от YPO0770–YPO0778 генов, составляющих HPI-2, можно предположить участие этого подвижного элемента в перемещении и перестройках HPI-2. Интересно отметить, что HPI-2 обнаруживается у всех эпидемических штаммов *Y. pestis*, однако содержит по крайней мере две мутации в *unp* локусе. Так, ген *YPTB3297* разделен на две части вставкой мобильного элемента IS100 и содержит сдвиг рамки в С-терминальной области [45]. В штамме эндемичного *Y. pestis* 91001 *Microtus* этот ген, хоть и не несет вставки мобильного элемента, сохраняет мутацию со сдвигом рамки, как и в эпидемических штаммах чумного микроба. Поскольку *unp* кластер полностью отсутствует у представителей *Y. enterocolitica*, а в чумном микробе несет делеции и генетические перестройки, то возможная активность данного генетического элемента, скорее всего, ограничивается штаммами *Y. pseudotuberculosis*, в которых он может продуцировать сидерофор псевдохелин, Pch [10]. Интересно отметить, что в эпидемических штаммах *Y. pseudotuberculosis* O1, вызывающих дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку, и примерно у 50% штаммов *Y. pseudotuberculosis* серотипа O3 полностью отсутствуют остров высокой патогенности и гены, ответственные за синтез йерсиниобакина. Однако эти штаммы содержат *unp* локус и способны к продукции сидерофора, обладая при этом высокой патогенностью. Это, скорее всего, свидетельствует об активности альтернативного йерсиниобакину сидерофора, псевдохелина, по крайней мере у части штаммов псевдотуберкулезного микроба.

Влияние HPI на вирулентность

Является ли HPI и кодируемая им функция детерминантой патогенности или все же элементом поддержания фитнеса?

Само название «остров высокой патогенности» подразумевает, что йерсиниобакин, кодируемый островом, участ-

вует в проявлении высокой патогенности, или способности убивать мышей. С другой стороны, остров широко распространен не только у патогенных бактерий [46], что говорит против его непосредственного участия в патогенезе, а скорее, опосредованно, реализуя способность бактерий сохранять для выживания в хозяйском организме необходимый физиологический статус.

Было показано, что выключение любого гена, связанного с продукцией йерсиниобакина, приводит к выраженной аттенуации *Y. enterocolitica* [29, 33, 47]. Активный захват железа йерсиниобакином критичен и для *Y. pestis* при 37°C, т.е. при температуре, с которой встречаются бактерии в тканях организма млекопитающих [48]. Это естественно, поскольку для эффективного размножения патогенному организму требуется достаточное количество железа, которое в хозяйском организме находится в связанной форме. Оказалось также, что клетки кишечной палочки, продуцирующие йерсиниобакин, защищены от переваривания в фагоцитах при воздействии супероксида. При этом продемонстрирована супероксид-дисмутазная активность Cu(II)-Ybt комплекса, образуемого при связывании ионов меди металлофором [49].

Гены острова, ответственные за продукцию йерсиниобакина, принадлежат к высокоиндуцируемым как при повышении температуры, так и при попадании в организм хозяина [50, 51]. Это также свидетельствует об их вовлеченности в инфекционный процесс. По-видимому, Ybt система важна на ранней стадии проникновения через кожные покровы и лимфатическую систему при бубонной чуме, при которой как снабжение катионами металлов, так и защита от фагоцитоза играет значительную роль и не важна в септицемической стадии [22]. При этом важное значение имеет тесное взаимодействие транспортных систем ионов Zn.

О важности присутствия острова высокой патогенности для реализации йерсиниями вирулентности говорят и данные следующих экспериментов. Мобилизация острова с по-

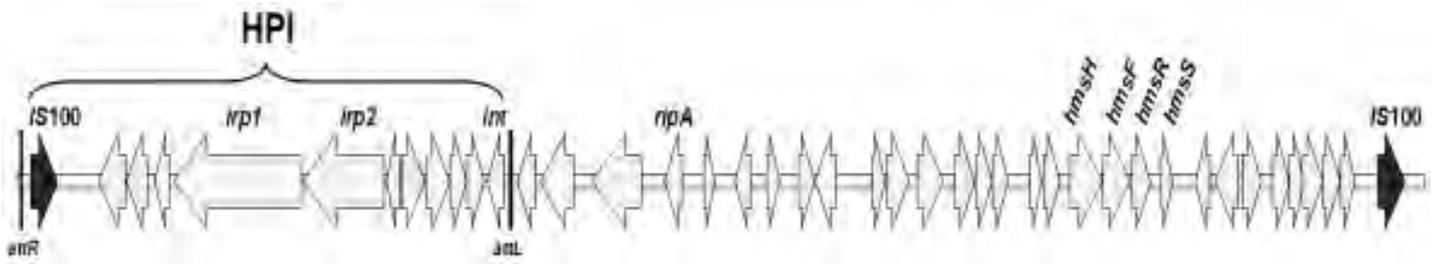


Рис. 4. Локус пигментации чумного микроба с островом высокой патогенности HPI. Частично показаны гены, ответственные за продукцию йерсениобактина (*irp*), пигментацию (*hms*) и вставочные последовательности IS100.

мощью FRT-FLP рекомбинации и передача его низкопатогенным *Y. enterocolitica* O:9 и непатогенным *Y. enterocolitica* O:5 сопровождалась появлением способности продуцировать йерсениобактин только у *Y. enterocolitica* O:9 [52]. Более того, приобретение острова сопровождалось увеличением вирулентности *Y. enterocolitica* O:9 для мышей. Это демонстрирует не только необходимость кодируемых островом функций для реализации фенотипа «высокой патогенности» в *Y. enterocolitica*, но и вовлеченность определенных функций хозяйской клетки в реализацию этого фенотипа.

Бактериям требуются крайне эффективные акцепторы железа для его мобилизации из состава железосвязывающих белков организма хозяйской клетки. Йерсениобактин является одним из таких эффективных низкомолекулярных металлофоров. Следовательно, наличие HPI крайне необходимо для обеспечения реализации свойства патогенности йерсиний. В то же время остров высокой патогенности не содержит каких-либо генов, напрямую связанных с продукцией токсинов, импединов или других агентов агрессии патогенных микроорганизмов, и поэтому вряд ли может быть отнесен к детерминантам патогенности. Однако полностью исключить то, что йерсениобактин или его предшественники являются, например, иммуномодуляторами хозяйского ответа, в настоящее время нельзя.

Механизмы и структуры, ответственные за перемещения HPI в геноме хозяйской клетки

Многие геномные острова представляют собой «тени», нагруженные всевозможными обломками генов, свидетельствующими об их прежней генетической активности. В отличие от большинства островов, HPI является активным островом, способным к перемещению в геноме клетки хозяина, по крайней мере, в чумном микробе и возбудителе псевдотуберкулеза 1 серотипа.

Высокая «подвижность» HPI, а вернее, его нестабильность в геноме чумного микроба, послужила основанием для представления о нем как о подвижном геномном острове. Однако первоначальные данные о подвижности острова отражали мобильность не самого HPI, а скорее, нестабильность *pgm*-локуса (*p*igmentat*ion* locus, *pgm*), ответственного за накопление пигментов клетками чумного микроба (рис. 4). Оказалось, что HPI-1 расположен внутри 102-т.п.о. локуса, связанного с накоплением в бактериальной клетке пигментов (гемин или Конго красный) и формированием биопленок при колонизации блох (*hms*-кластер) [53], а также ответственного за синтез противовоспалительного фактора RipA, связанного с выживанием в активированных макрофа-

гах [54]. Этот локус пигментации, ограниченный двумя копиями IS100 элемента, легко и с высокой частотой выщепляется из генома чумного микроба при гомологичной рекомбинации между двумя фланкирующими его IS100 элементами. При этом, естественно, утрачивается не только сам нестабильный локус пигментации, но и HPI как неотъемлемая часть этого локуса. В свое время это и привело к представлению о том, что именно локус пигментации собственно и является островом патогенности.

В дальнейшем, однако, была обозначена четкая граница между поведением локуса пигментации и собственно HPI, который мог перемещаться в геноме за счет сайтспецифической рекомбинации, независимо от 102-т.п.о. локуса. Так, было показано, что HPI способен активно перемещаться в геноме псевдотуберкулезного микроба, занимая любой из свободных сайтов интеграции, *asn* tRNA [5, 7]. Поскольку *pgm*-локус не фланкирован IS100 элементами в *Y. pseudotuberculosis*, и, более того, остров может занимать любую свободную копию *asn* tDNA в геноме псевдотуберкулезного микроба, сайтспецифическая рекомбинация, обеспечиваемая HPI-рекомбиназой, сопровождается перетранспозицией острова в новые мишени. В некоторых штаммах это происходит с достаточно высокой частотой [5, 7].

Генетический модуль HPI состоит из рекомбиназы (IntB интегразы), ответственной за интегративную рекомбинацию острова с *asn* tRNA-мишенью на геноме хозяйской клетки, а также за эксцизию при выщеплении острова [40]. В переменной части острова *Y. pestis* (*Yps* HPI) находится эксцизионаза (Hef), или фактор, определяющий направление рекомбинации (*recombination directionality factor*, RDF) [55, 56]. Однако, в отличие от RDF бактериофага λ , который увеличивает частоту эксцизии в миллионы раз, RDF HPI лишь незначительно влияет на частоту эксцизии острова, увеличивая ее менее чем в 10 раз [55]. По-видимому, в отличие от интегразы фага λ , рекомбиназа HPI представляет собой низкоспециализированную рекомбиназу, которой одинаково свойственны интегративная и эксцизивная функции, в то время как активность рекомбиназы бактериофага λ специализирована исключительно на интегративной функции.

Сайты узнавания, участвующие в сайтспецифической рекомбинации (*attachment sites*, *att*), представлены по аналогии с бактериофагом λ , бактериальным сайтом BOB' (*attB*) и сайтом, расположенным на самом острове патогенности, POP' (*attP*). В результате рекомбинации образуются гибридные сайты, BOP' (*attL*) и POB' (*attR*), фланкирующие интегрированный HPI (рис. 5). Бактериальный участок узнавания, *attB*, представлен 3' последовательностью генов *asn* tRNA.

Таких мишеней четыре в геноме *E. coli* и три в геноме йерсиний. С использованием плазмиды, несущей *IntB* рекомбиназу и *attP*, представляющую собой своеобразный «мини-остров», была показана способность рекомбиназы узнавать и интегрировать в любую из свободных ДНК-мишеней [40]. Возможность перетранспозиции НПИ в свободные копии *asn* tDNA была продемонстрирована для возбудителя псевдотуберкулеза [7]. Однако при наличии практически полной гомологии островов возбудителя псевдотуберкулеза и чумы для последнего до сих пор не показана возможность перемещения острова в свободные копии *asn* tDNA. Одним из факторов, «маскирующих» транспозицию острова в геноме чумного микроба, может служить происходящее за счет гомологичной рекомбинации делетирование области пигментации (*pgm* локуса), частью которого является НПИ (см. рис. 4). В результате подобной высокочастотной делеции утрачивается один из *att* сайтов (*attR*) острова, что полностью исключает возможность осуществления сайт-специфической рекомбинации. Отсутствие второй копии вставочной последовательности IS100 у *Y. pseudotuberculosis* O:1, которая могла бы участвовать в выщеплении *pgm*-локуса у этих йерсиний, либо несцепленное наследование острова в других копиях *asn* tDNA [7] снимает этот эффект у возбудителя псевдотуберкулеза.

Механизмы, ответственные за латеральное (горизонтальное) распространение острова

Если перемещение НПИ в геноме хозяйской клетки и его механизм в целом не вызывают сомнения, то вопрос о возможности межклеточного переноса острова новым бактериальным хозяевам долгое время оставался открытым.

Первичные представления о возможности переноса Ybt острова бактериофагами, представляются маловероятными. Как правило, подобные воззрения базировались на наличии гомологии рекомбиназы НПИ и интегразы бактериофага P4 [41]. Однако подобное сходство, скорее всего, свидетельствует об общности механизмов сайтспецифической рекомбинации у большой группы мобильных генетических элементов и их происхождения, нежели о непосредственном участии фагов в перемещении геномных островов. Скорее всего, интегразы геномных островов представляют собой отдельную эволюционную ветвь сайтспецифических рекомбиназ, использующих уникальный механизм связывания ДНК [57]. Небольшие размеры фаговой головки и необходимость специфического выщепления и интеграции острова хоть и не исключают участия трансдукции в передаче НПИ, но вряд ли свидетельствуют о ее предпочтительности, по крайней мере, для острова высокой патогенности.

Более вероятным представляется перенос острова конъюгативными плазмидами, которые могут при некорректном выщеплении из хромосомы хозяйской клетки захватывать близлежащие последовательности ДНК (по типу F' у кишечной палочки). При этом полноценная в функциональном и генетическом отношении копия НПИ корректно выщепляется из сайта первичной интеграции аспарагиновой транспортной ДНК и реинтегрирует в конъюгативную плазмиду, содержащую последовательность *asn* tDNA. Подобные плазмиды, содержащие *asn* tDNA мишени и циркулирующие, в частности, в популяциях вирулентных микро-

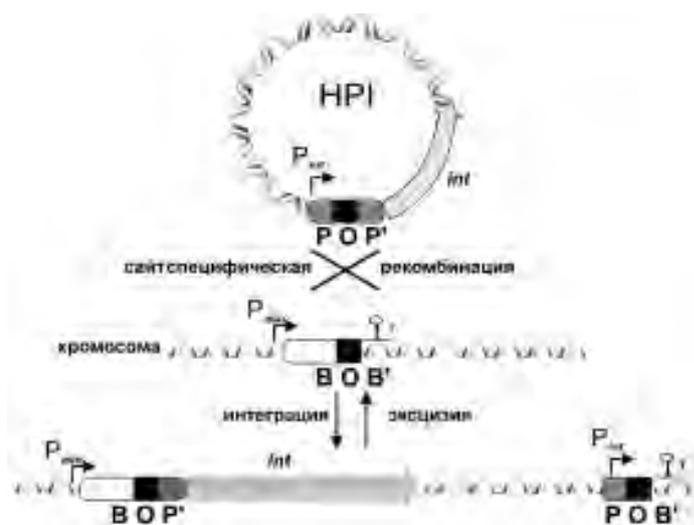


Рис. 5. Схема сайтспецифической рекомбинации острова высокой патогенности. Обозначены гены и структуры, участвующие в рекомбинации. Буквами P и T обозначены соответственно промоторы и терминаторы аспарагиновой тРНК и рекомбиназы *Int*.

бов, уже описаны в литературе [58]. Их образование при некорректном вырезании конъюгативных плазмид из хромосомы с захватом близлежащих генов, в том числе и последовательностей, которые могут служить в качестве сайтов интеграции подвижных элементов, достаточно хорошо описано для F' эписом [59, 60]. Такая возможность для НПИ была показана на примере конъюгативной плазмиды RP4, несущей последовательность *asn* tDNA [60]. Приобретение бактериальной клеткой подобной «шаттл»-плазмиды сопровождается появлением в клетке дополнительной *asn* tDNA мишени, в которую может встроиться остров (рис. 6). В результате рекомбинации образуется трансмиссивный коинтегра́т НПИ с плазмидой RP4, которая, обладая широким диапазоном хозяев, может легко передаваться новым бактериальным клеткам. Распад коинтегра́та с использованием сайтспецифической рекомбинации сопровождается выщеплением НПИ и перетранспозицией его в новый свободный сайт в геноме хозяйской клетки. В результате такой последовательности событий НПИ интегрирует в геном нового хозяина, что сопровождается появлением у того новых свойств, кодируемых генами, расположенными на острове. Так, в результате опосредованного таким трансмиссивным коинтегра́том переноса НПИ в клетки кишечной палочки, последние приобрели способность продуцировать йерсиниобакин [61].

Не исключен и другой вариант передачи НПИ, при котором конъюгативный репликон уже интегрирован в последовательности самого НПИ, что придает ему свойство трансмиссивности [62], или мобилизуемости (см. рис. 1) [63]. Такой рекомбинантный остров, состоящий частично из плазмиды, ответственной за конъюгативный перенос, был описан в *K. pneumoniae* [62]. Его можно отнести к группе интегративных – конъюгативных элементов (integrative and conjugative elements, ICE), способных к самопереносу, что и было показано экспериментально. Однако в *E. coli* подобный ICE был обнаружен в единичном штамме, а в *K. pneumoniae* распространение ICEKp1 было ограничено группой штаммов, вызывающих пиогенные абсцессы печени. Подобные ограни-

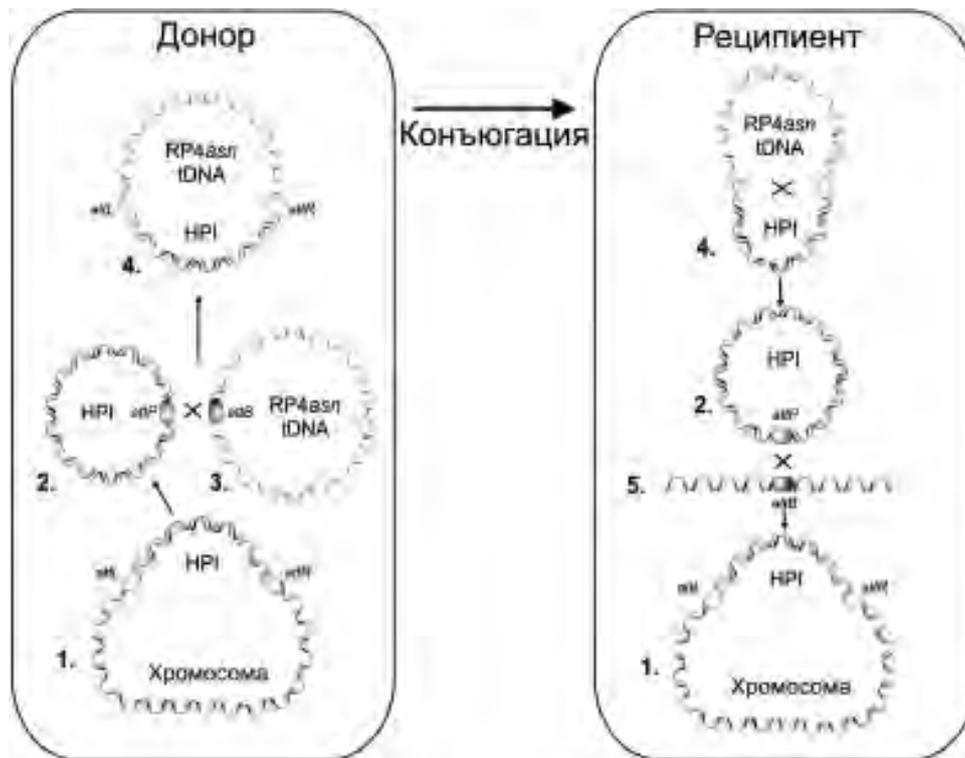


Рис. 6. Механизм RP4'asn-опосредованного горизонтального переноса острова высокой патогенности. 1 – бактериальная хромосома с интегрированным HPI; 2 – свободная форма острова с восстановленным attP-сайтом; 3 – RP4'asn «шаттл»-плаزمид с attB-сайтом; 4 – RP4'asn::HPI коинтеграция; 5 – бактериальная хромосома со свободным attB-сайтом.

чения, учитывая высокую степень гомологии обоих подвижных элементов, говорят скорее в пользу уникальности подобного способа передачи HPI, чем о ее универсальном характере.

Таким образом, остров высокой патогенности не обладает собственными генами, отвечающими за его трансмиссивность и репликацию. Этим он отличается от интегративных трансмиссивных плазмид. В свою очередь, он отличается от бактериофагов тем, что не содержит генов, отвечающих за синтез фаговых белков. Это указывает на уникальность островов патогенности среди остальных мобильных элементов, которые могут быть определены как мобильные элементы, содержащие гены, ответственные за рекомбинацию с геномом хозяйской клетки, но не содержащие генов, ответственных за трансмиссию и репликацию.

Заключение

Остров высокой патогенности йерсиний представляет собой интегративный мобильный элемент, ответственный прежде всего за синтез металлофора йерсиниобактина Ybt, участвующего в транспорте целого ряда катионов, включая железо. Приобретение бактериальными клетками Ybt кластера увеличивает фитнес несущих его хозяев и позволяет им полноценно реализовать свойство патогенности за счет обеспечения необходимым *in vivo* железом и другими катионами. Сохранение некоторыми йерсиниями делетированных форм острова свидетельствует о возможной функциональной роли промежуточных продуктов метаболизма металлофора.

Помимо Ybt-генов, остров содержит гены, ответственные за его корректную рекомбинацию с *asn* tDNA мишенями в

геноме хозяйской клетки. Выщепление острова за счет сайт-специфической рекомбинации может приводить к его перетранспозиции в новые свободные мишени и широкому распространению. Отсутствие собственных генов, отвечающих за трансмиссивность и репликацию этого мобильного элемента, «восполняется» его способностью к образованию коинтеграции с конъюгативными плазмидами, которые и могут отвечать за его широкое распространение у *Enterobacteriaceae*.

Литература/References

1. Neubauer H, Aleksic S, Hensel A, Finke EJ, Meyer H. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol.* 2000 Mar;290(1):61-4. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80107-1
2. Heesemann J. Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species. *FEMS Microb Lett.* 1987;48:229-33.
3. Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol.* 1997 Mar;23(6):1089-97.
4. Williams KP. Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:866-75.
5. Hare JM, Wagner AK, McDonough KA. Independent acquisition and insertion into different chromosomal locations of the same pathogenicity island in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol.* 1999 Jan;31(1):291-303.
6. Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect.* 2001;3:561-9.
7. Buchrieser C, Brosch R, Bach S, Guiry A, Carniel E. The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn* tRNA genes. *Mol Microbiol.* 1998 Dec;30(5):965-78.

8. Rakin A, Urbitsch P, Heesemann J. Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species. *J Bacteriol.* 1995 May;177(9):2292-8.
9. Hinchliffe SJ, Isherwood KE, Stabler RA, Prentice MB, Rakin A, Nichols RA, et al. Application of DNA microarrays to study the evolutionary genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Res.* 2003 Sep;13(9):2018-29. DOI: 10.1101/gr.1507303
10. Rakin A, Schneider L, Podladchikova O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Nov 30;2:151. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00151
11. Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E, Heesemann J. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun.* 1998 Feb;66(2):480-5.
12. Bach S, de Almeida A, Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Feb 15;183(2):289-94.
13. Oelschlaeger TA, Zhang D, Schubert S, Carniel E, Rabsch W, Karch H, Hacker J. The high-pathogenicity island is absent in human pathogens of *Salmonella enterica* subspecies I but present in isolates of subspecies III and VI. *J Bacteriol.* 2003 Feb;185(3):1107-11.
14. Petermann SR, Sherwood JS, Logue CM. The *Yersinia* high pathogenicity island is present in *Salmonella enterica* Subspecies I isolated from turkeys. *Microb Pathog.* 2008 Aug;45(2):110-4. DOI: 10.1016/j.micpath.2008.04.001.
15. Souza Lopes AC, Rodrigues JF, Cabral AB, da Silva ME, Leal NC, da Silveira VM, de Moraes Júnior MA. Occurrence and analysis of *irp2* virulence gene in isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter spp.* from microbiota and hospital and community-acquired infections. *Microb Pathog.* 2016 Jul;96:15-9. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.04.018
16. Tu J, Xue T, Qi K, Shao Y, Huang B, Wang X, Zhou X. The *irp2* and *fyuA* genes in High Pathogenicity Islands are involved in the pathogenesis of infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pol J Vet Sci.* 2016;19(1):21-9. DOI: 10.1515/pjvs-2016-0004.
17. Rakin A, Noeltling C, Schubert S, Heesemann J. Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* 1999 Oct;67(10):5265-74/
18. Haag H, Hantke K, Drechsel H, Stojilkovic I, Jung G, Zähner H. Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol.* 1993 Sep;139(9):2159-65. DOI: 10.1099/00221287-139-9-2159
19. Cox CD, Rinehart KL Jr, Moore ML, Cook JC Jr. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Jul;78(7):4256-60.
20. Actis LA, Fish W, Crosa JH, Kellerman K, Ellenberger SR, Hauser FM, Sanders-Loehr J. Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1). *J Bacteriol.* 1986 Jul;167(1):57-65.
21. Bobrov AG, Kirillina O, Fosso MY, Fetherston JD, Miller MC, VanCleave TT, et al. Zinc transporters YbtX and ZnuABC are required for the virulence of *Yersinia pestis* in bubonic and pneumonic plague in mice. *Metallomics.* 2017 Jun 21;9(6):757-772. doi: 10.1039/c7mt00126f.
22. Perry RD, Bobrov AG, Fetherston JD. The role of transition metal transporters for iron, zinc, manganese, and copper in the pathogenesis of *Yersinia pestis*. *Metallomics.* 2015 Jun;7(6):965-78. DOI: 10.1039/c4mt00332b.
23. Koh EI, Henderson JP. Microbial Copper-binding Siderophores at the Host-Pathogen Interface. *J Biol Chem.* 2015 Jul 31;290(31):18967-74. doi: 10.1074/jbc.R115.644328
24. Koh EI, Hung CS, Parker KS, Crowley JR, Giblin DE, Henderson JP. Metal selectivity by the virulence-associated yersiniabactin metallophore system. *Metallomics.* 2015 Jun;7(6):1011-22. DOI: 10.1039/c4mt00341a.
25. Moscatello NJ, Pfeifer BA. Yersiniabactin metal binding characterization and removal of nickel from industrial wastewater. *Biotechnol Prog.* 2017 Nov;33(6):1548-1554. DOI: 10.1002/btpr.2542.
26. Gehring AM, DeMoll E, Fetherston JD, Mori I, Mayhew GF, Blattner FR, et al. Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem Biol.* 1998 Oct;5(10):573-86.
27. Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jan;10(1):35-66.
28. Rakin A, Schubert S, Pelludat C, Brem D, Heesemann J. The high-pathogenicity island of yersiniae, p. 77-90. In J. Kaper and J. Hacker (ed.), *Pathogenicity islands and other mobile virulence elements*, in press. ASM Press, 1999b. Washington, D.C.
29. Rakin A, Saken E, Harmsen D, Heesemann J. The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. *Mol Microbiol.* 1994 Jul;13(2):253-63.
30. Staggs TM, Perry RD. Fur regulation in *Yersinia* species. *Mol Microbiol.* 1995;17:601.
31. Jacobi CA, Gregor S, Rakin A, Heesemann J. Expression analysis of the yersiniabactin receptor gene *fyuA* and the heme receptor *hemR* of *Yersinia enterocolitica* *in vitro* and *in vivo* using the reporter genes for green fluorescent protein and luciferase. *Infect Immun.* 2001 Dec;69(12):7772-82.
32. Fetherston JD, Bertolino VJ, Perry RD. YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol.* 1999 Apr;32(2):289-99.
33. Brem D, Pelludat C, Rakin A, Jacobi CA, Heesemann J. Functional analysis of yersiniabactin transport genes of *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology.* 2001 May;147(Pt 5):1115-27.
34. Anisimov R, Brem D, Heesemann J, Rakin A. Molecular mechanism of YbtA-mediated transcriptional regulation of divergent overlapping promoters *ybtA* and *irp6* of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Sep 1;250(1):27-32.
35. Anisimov R, Brem D, Heesemann J, Rakin A. Transcriptional regulation of high pathogenicity island iron uptake genes by YbtA. *Int J Med Microbiol.* 2005 Apr;295(1):19-28.
36. Fetherston JD, Bearden SW, Perry RD. YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol Microbiol.* 1996 Oct;22(2):315-25.
37. Pelludat C, Brem D, Heesemann J. Irp9, encoded by the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*, is able to convert chorismate into salicylate, the precursor of the siderophore yersiniabactin. *J Bacteriol.* 2003 Sep;185(18):5648-53.
38. Bobrov AG, Geoffroy VA, Perry RD. Yersiniabactin production requires the thioesterase domain of HMWP2 and YbtD, a putative phosphopantetheinylate transferase. *Infect Immun.* 2002 Aug;70(8):4204-14.
39. Ohlemacher SI, Giblin DE, d'Avignon DA, Stapleton AE, Trautner BW, Henderson JP. Enterobacteria secrete an inhibitor of *Pseudomonas* virulence during clinical bacteriuria. *J Clin Invest.* 2017 Nov 1;127(11):4018-4030. doi: 10.1172/JCI92464.
40. Rakin A, Noeltling C, Schropp P, Heesemann J. Integrative module of the high-pathogenicity island of *Yersinia*. *Mol Microbiol.* 2001 Jan;39(2):407-15.
41. Bach S, Buchrieser C, Prentice M, Guiyoule A, Msadek T, Carniel E. The high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica* Ye8081 undergoes low-frequency deletion but not precise excision, suggesting recent stabilization in the genome. *Infect Immun.* 1999 Oct;67(10):5091-9.
42. Schubert S, Rakin A, Fischer D, Sorsa J, Heesemann J. Characterization of the integration site of *Yersinia* high-pathogenicity island in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999 Oct 15;179(2):409-14.
43. Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, Prentice MB, et al. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature.* 2001 Oct 4;413(6855):523-7. DOI: 10.1038/35097083
44. Perry RD, Fetherston JD. Iron and Heme Uptake systems, "*Yersinia* Molecular and Cellular Biology", eds. E.Carniel and J.Hinnebusch. Norfolk: Horizon Bioscience, 2004, p. 257-283.
45. Forman S, Paultey JT, Fetherston JD, Cheng YQ, Perry RD. *Yersinia* ironomics: comparison of iron transporters among *Yersinia pestis* biotypes and its nearest neighbor, *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biometals.* 2010;23(2):275-94.

46. Schubert S, Rakin A, Heesemann J. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol.* 2004 Sep;294(2-3): 83-94.
47. Pelludat C, Rakin A, Jacobi CA, Schubert S, Heesemann J. The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. *J Bacteriol.* 1998 Feb;180(3):538-46.
48. Bearden SW, Fetherston JD, Perry RD. Genetic organization of the yersiniabactin biosynthetic region and construction of avirulent mutants in *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* 1997 May;65(5):1659-68.
49. Chaturvedi KS, Hung CS, Giblin DE, Urushidani S, Austin AM, Dinauer MC, Henderson JP. Cupric yersiniabactin is a virulence-associated superoxide dismutase mimic. *ACS Chem Biol.* 2014;9(2):551-61.
50. Han Y, Zhou D, Pang X, Song Y, Zhang L, Bao J, et al. Microarray analysis of temperature-induced transcriptome of *Yersinia pestis*. *Microbiol Immunol.* 2004; 48(11):791-805.
51. Lathem WW, Crosby SD, Miller VL, Goldman WE. Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 6;102(49):17786-91.
52. Pelludat C, Hogardt M, Heesemann J. Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to *Y. enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect Immun.* 2002 Apr;70(4):1832-41.
53. Hinnebusch BJ. Bubonic plague: a molecular genetic case history of the emergence of an infectious disease. *J Mol Med.* 1997;75:645-52.
54. Pujol C, Grabenstein JP, Perry RD, Bliska JB. Replication of *Yersinia pestis* in interferon γ -activated macrophages requires *ripA*, a gene encoded in the pigmentation locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 6;102(36):12909-14. DOI: 10.1073/pnas.0502849102
55. Antonenka U, Nölting C, Heesemann J, Rakin A. Independent acquisition of site-specific recombination factors by *asn* tRNA gene-targeting genomic islands. *Int J Med Microbiol.* 2006 Oct;296(6):341-52.
56. Lesic B, Bach S, Ghigo JM, Dobrindt U, Hacker J, Carniel E. Excision of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* requires the combined actions of its cognate integrase and Hef, a new recombination directionality factor. *Mol Microbiol.* 2004 Jun;52(5):1337-48.
57. Szwagierczak A, Antonenka U, Popowicz GM, Sitar T, Holak TA, Rakin A. Structures of the arm-type binding domains of HPI and HA17 integrases. *J Biol Chem.* 2009;284(46):31664-71.
58. Kidgell C, Pickard D, Wain J, James K, Diem Nga LT, Diep TS, et al. Characterisation and distribution of a cryptic *Salmonella typhi* plasmid pHCM2. *Plasmid.* 2002 May; 47(3):159-71.
59. Jaoua S, Letouvet-Pawlak B, Monnier C, Guespin-Michel JF. Mechanism of integration of the broad-host-range plasmid RP4 into the chromosome of *Myxococcus xanthus*. *Plasmid.* 1990 May;23(3):183-93.
60. Rigby CE, Fraser AD. Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. *Can J Vet Res.* 1989 Jul;53(3):326-30.
61. Antonenka U, Nölting C, Heesemann J, Rakin A. Horizontal transfer of *Yersinia* high-pathogenicity island by the conjugative RP4 *attB* target-presenting shuttle plasmid. *Mol Microbiol.* 2005 Aug;57(3):727-34. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04722.x
62. Lin TL, Lee CZ, Hsieh PF, Tsai SF, Wang JT. Characterization of integrative and conjugative element ICE*Kp1*-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J Bacteriol.* 2008 Jan; 190(2):515-26. DOI: 10.1128/JB.01219-07
63. Schubert S, Dufke S, Sorsa J, Heesemann J. A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Mol Microbiol.* 2004 Feb;51(3):837-48.

НОВОСТИ НАУКИ

Антибиотикоустойчивость у морских бактерий

Ученые Гонконгского политехнического университета обнаружили гены антибиотикоустойчивости у морской бактерии *Vibrio parahaemolyticus*, предположительно полученные от *E. coli*.

Li R. et al. 2016.

Genetic Characterization of a bla VEB-2 – carrying plasmid in Vibrio parahaemolyticus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy AAC.01749-16. DOI: 10.1128/AAC.01749-16

Находящийся на стадии становления микроб, подобный сибиреязвенному

Ученые из Института Роберта Коха, Германия открыли новую бактерию, относящуюся к *Bacillus anthracis* и вызывающая сибирскую язву, – по-видимому, она повторяет симптомы сибирской язвы у различных млекопитающих в Африке. Этот новый патоген имеет гены, сходные с *Bacillus cereus*, другим родственным видом, который может вызвать отравление пищи, но содержит два участка генетического материала, которые можно увидеть только у *B. anthracis*. Такая добавка приближает поведение нового вида к поведению микроба, вызывающего сибирскую язву, несмотря на его происхождение от штамма *B. cereus*. Эти результаты показывают, что для понимания влияния нового микроба как на животных, так и на человек, может оказаться необходимым более тщательный надзор.

Antonation K.S., et al. 2016.

Bacillus cereus Biovar Anthracis Causing Anthrax in Sub-Saharan Africa—Chromosomal Monophyly and Broad Geographic Distribution. PLOS Neglected Tropical Diseases 10, e0004923. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004923

Свойства бактерий *F. tularensis subsp. holarctica*, лишенных способности синтезировать белок igIc

А.Н.Мокриевич, В.М.Павлов, Г.М.Вахрамеева, Р.И.Миронова,
Т.И.Комбарова, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, И.А.Дятлов

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

Получен вариант референс-штамма *F. tularensis subsp. holarctica* 503 с делетированными двумя копиями гена *igIc* – *F. tularensis* 3m/23-2. Этот штамм авирулентен для мелких лабораторных животных и обладает сниженной способностью размножаться в мышинных макрофагах по сравнению с вакцинным штаммом 15 НИИЭГ. В организме экспериментальных мышей бактерии штамма 3m/23-2 сохранили способность к диссеминации от места введения до селезенки, но потеряли способность к размножению в этом органе. Иммунизация мышей линии BALB/c штаммом 3m/23-2 защищала экспериментальных животных от последующего заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* как подвида *holarctica*, так и подвида *tularensis*. Уровень защиты был дозозависимым и зависел от подвида возбудителя туляремии.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, подвида *holarctica*, ген *igIc*, фагоцитоз, протективность

Для цитирования: Мокриевич А.Н., Павлов В.М., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Дятлов И.А. Свойства бактерий *F. tularensis subsp. holarctica*, лишенных способности синтезировать белок igIc. Бактериология. 2017; 2(4): 17–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-17-24

Properties of *F. tularensis subsp. holarctica* bacteria deprived the ability to synthesize igIc protein

A.N.Mokrievich, V.M.Pavlov, G.M.Vakhrameeva, R.I.Mironova,
T.I.Kombarova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, I.A.Dyatlov

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

The strain *F. tularensis* 3m/23-2 has been constructed from the reference strain *F. tularensis subsp. holarctica* 503, by deleting of two copies of the *igIc* gene. The strain is avirulent for small laboratory animals and has a reduced ability to proliferate in murine macrophages compared to the vaccine strain 15 NIEG. Bacteria of the strain 3m/23-2 retained their ability to disseminate from the site of injection to the spleen in the mice, but lost the ability to reproduce in the organ itself. Immunization of BALB/c mice with strain 3m/23-2 provided protection for animals against subsequent infection with *F. tularensis* virulent strains both of subspecies *holarctica* and *tularensis*. The level of protection was dose-dependent and relied upon a subspecies of the causative agent of tularemia.

Keywords: *Francisella tularensis*, subspecies *holarctica*, *igIc* gene, phagocytosis, protectivity

For citation: Mokrievich A.N., Pavlov V.M., Vakhrameeva G.M., Mironova R.I., Kombarova T.I., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Dyatlov I.A. Properties of *F. tularensis subsp. holarctica* bacteria deprived the ability to synthesize igIc protein. Bacteriology. 2017; 2(4): 17–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-17-24

F *tularensis* – факультативный внутриклеточный паразит, вызывающий туляремию у людей и восприимчивых теплокровных животных. Уникальной особенностью возбудителя туляремии является его способность проникать в макрофаги *F. tularensis* по особому механизму эндоцито-

за [1] и быстро перемещаться из фагосомы в цитозоль, где происходит его интенсивное размножение [2]. При достижении определенной концентрации микроорганизма в цитозоле запускается апоптоз инфицированной клетки [3]. Бактерии со связанными фрагментами компонентов макрофа-

Для корреспонденции:

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) 36-0117

E-mail: mokrievich@obolensk.org

Статья поступила 11.11.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, 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) 36-0117

E-mail: mokrievich@obolensk.org

The article was received 11.11.2017, accepted for publication 22.12.2017

гов выходят во внеклеточную среду организма и повторно захватываются фагоцитами [4].

Бактерии *F. tularensis* для перемещения из фагосомы в цитозоль используют систему секреции типа VI [2]. Одним из ключевых элементов этой системы является белок IgIC. Белок IgIC кодируется геном *iglC*, представленным в геномах бактерий *F. tularensis* эпидемически значимых подвидов *tularensis*, *holarctica* и *mediasiatica* двумя копиями, а в подвиде *novicida* – одной копией [5]. В других представителях рода *Francisella* ген *iglC* также присутствует в единственной копии.

Удаление обеих копий гена *iglC* в вакцинном штамме 15 НИИЭГ, штаммах LVS и Schu приводило к их полной аттенуации для экспериментальных мышей различных генетических линий [6–8]. Эти штаммы были не способны защищать экспериментальных мышей от последующего заражения вирулентными бактериями *F. tularensis* [7, 8]. Однако до настоящего времени отсутствует информация о протективных свойствах варианта природного штамма подвида *holarctica*, лишенного способности экспрессировать белок IgIC.

Целью настоящей работы является создание и изучение свойств бактерий *F. tularensis* подвида *holarctica* без генов *iglC*.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и плазмиды. Перечень штаммов и плазмид, использованных в работе, представлен в таблице.

Условия культивирования. Штаммы *E. coli* выращивали при температуре 37°C в среде Лурия–Бертани (LB) [10] (на агаре или в бульоне), при необходимости в среду добавляли антибиотики (100 мкг мл⁻¹ ампициллина или 20 мкг мл⁻¹ хлорамфеникола). Штаммы *F. tularensis* выращивали при температуре 37°C на плотной (FTA) и в жидкой (FTB) питательных средах. Состав FTA: эритрит-агар – 3,8%, высушенная кровь крупного рогатого скота – 1%, глюкоза – 1%, цистеин – 0,05%, тиамин хлорид – 0,0025%, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Московская обл.). Состав FTB: ферментативный гидролизат казеина – 2%, дрожжевой экстракт – 1%, КН₂РО₄ – 1,2%, глюкоза – 1%, цистеин – 0,001%, FeCl₂ – 0,001%, pH 7,2 [11]. При необходимости в среду добавляли 100 мкг мл⁻¹ полимиксина В и 6 мкг мл⁻¹ хлорамфеникола.

Животные. В работе использовали аутбредных мышей Swiss Webster, мышей линий BALB/c(H2d), C57BL6 (возраст – 6–8 нед, вес – 18–20 г, питомник «Пущино», ФИБХ, г. Пущино, МО) и морских свинок (возраст – 5–7 нед, вес – 350–450 г, питомник «Андреевка», ГНЦ БМТ, п. Андреевка, Солнечногорский р-н, МО). Работы с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации [12] и Директивой Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [13]. Содержание и манипуляции с животными выполняли в виварии, соответствующем требованиям GAC (Good Animal Care) и протоколу № P03-20 комитета по биоэтике ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.

Модификация генома туляремийного микроба. Удаление генов *iglC* из хромосомы бактерий *F. tularensis* проводили по ранее разработанной методике [6, 7, 9]. Праймеры для вы-

явления модифицированного участка генома *F. tularensis* без нуклеотидной последовательности гена *iglC* – IGKF: 5'-AAGGATAAGACCTGTCGT-3' и IGKR: 5'-TTGAAACCATACC GGTA-3' были синтезированы в ЗАО «Синтол», Москва.

Фагоцитоз. Эксперименты по фагоцитозу проводили по ранее описанной методике [9]. Мышинные макрофагоподобные клетки линии J744.1A были получены из Российской коллекции клеточных культур, г. С.-Петербург, Россия. Перитонеальные макрофаги мышей линии BALB/c получали с помощью пятикратного промывания брюшной полости фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 0,1% глюкозы.

Заражение лабораторных животных. Вирулентность штаммов *F. tularensis* определяли на биологической модели инбредной линии мышей BALB/c обоего пола. Животным (по 5 особей в группе) вводили подкожно по 0,2 мл 10-кратных разведений бактериальных суспензий. За животными наблюдали в течение 28 дней. Погибших мышей вскрывали, селезенки гомогенизировали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) и суспензии клеток высевали на среду FTA с полимиксином. Величину LD₅₀ определяли по методу Kerber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [14].

Персистенция штаммов *F. tularensis* в селезенках мышей. Экспериментальным животным вводили подкожно клетки исследуемых штаммов *F. tularensis* в дозе 3 × 10¹ КОЕ

Таблица. Бактериальные штаммы и плазмиды		
Название	Характеристика	Источник или ссылка
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	<i>subsp. holarctica</i> , вакцинный штамм	«ГКПМ-Оболенск»
<i>F. tularensis</i> 15 R	<i>subsp. holarctica</i> , вариант штамма 15 НИИЭГ, дефектного по ЛПС	«ГКПМ-Оболенск»
<i>F. tularensis</i> 503	<i>subsp. holarctica</i> , вирулентный референс-штамм	«ГКПМ-Оболенск»
<i>F. tularensis</i> Schu	<i>subsp. tularensis</i> , природный штамм	«ГКПМ-Оболенск»
<i>F. tularensis</i> 15/23-2	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ с двумя делетированными копиями гена <i>iglC</i>	[9]
<i>F. tularensis</i> 3ml/23-2	<i>F. tularensis</i> 503 с двумя делетированными копиями гена <i>iglC</i>	Данная работа
<i>E. coli</i> S17-1 λ pir	(<i>thi pro hsdR⁺ hsdM⁺ recA</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7(Tp ^R Sm ^R)); лизогенный вариант штамма S17-1, продуцирующий π -белок, необходимый для репликации плазмид, содержащих <i>oriB</i> K	«ГКПМ-Оболенск»
<i>E. coli</i> S17(pPV2)	штамм S17-1 λ pir с векторной плазмидой pPV, Amp ^R , Cm ^R	[6]
<i>E. coli</i> S17(pPV Δ <i>iglC</i>)	штамм S17-1 λ pir с рекомбинантной плазмидой pPV Δ 23, Amp ^R , Cm ^R	[6]
pPV2	суицидный вектор для <i>F. tularensis</i> , Amp ^R , Cm ^R , <i>sacB</i> , <i>mob</i>	[6]
pPV Δ <i>iglC</i>	рекомбинантная суицидная плаزمида для <i>F. tularensis</i> со встроенной 3.0 п.о. областью генома <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ с делетированным геном <i>iglC</i> , Amp ^R , Cm ^R , <i>sacB</i> , <i>mob</i>	[6]

для штаммов 15 НИИЭГ и в дозе 1×10^6 КОЕ для штаммов 15/23-2 и 3m/23-2. Через 4, 7, 14 и 21 сут животных эвтаназировали, селезенки гомогенизировали и суспендировали в объеме 5 мл ЗФР. Из полученной взвеси готовили ряд десятикратных разведений и суспензии высевали на среду ФТА. Подсчет выросших на агаре колоний проводили через 72 ч.

Протективность. Количественную оценку способности исследуемых штаммов защищать животных от подкожного заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* проводили с использованием вирулентного тест-штамма *F. tularensis* 503 и природного штамма *F. tularensis* Schu. Животных, иммунизированных подкожно разными дозами исследуемого штамма (от 1×10^6 до 1×10^9 КОЕ/мышь), заражали 3×10^3 КОЕ вирулентного штамма. За животными наблюдали в течение 28 сут.

Устойчивость бактерий к нормальной кроличьей сыворотке (НКС). Нормальную кроличью сыворотку получали по стандартной методике [15]. Аликвоты сывороток до использования хранили при температуре минус 20°C. Стандартную суспензию бактерий в ЗФР готовили из ночной агаровой культуры по стандарту мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ НЦЭСМП) и разводили в ЗФР до концентрации 1×10^7 КОЕ/мл. 0,1 мл бактериальной суспензии смешивали с 0,9 мл НКС и инкубировали при температуре 37°C в течение 18 ч. Количество выживших в НКС клеток определяли высевом из соответствующих разведений на среду ФТА, содержащую 100 мкг мл⁻¹ полимиксина. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 72 ч.

Результаты и обсуждение

Созданные ранее молекулярные инструменты для аллельного обмена в хромосоме *F. tularensis* позволили ранее создать варианты вакцинного штамма 15 НИИЭГ и LVS, а также варианты природных штаммов подвида *tularensis* и *novicida* с делетированными генами *iglC* [6, 7, 9, 16]. Делеционные варианты, в отличие от исходных штаммов, были авирулентны для лабораторных мышей [6, 7, 8, 16]. Для сравнительного изучения свойств мутантных штаммов подвида *holarctica*, как природных, так и вакцинного, без генов *iglC*, методом аллельного обмена был создан вариант природного штамма *F. tularensis subsp. holarctica* 503, не содержащий данные гены. Модифицированный штамм получили с использованием суицидной плазмиды pPVΔ*iglC* по ранее разработанной двухэтапной методике [6]. Селекцию клонов без одной и двух копий гена *iglC* проводили с помощью ПЦР ДНК из колоний конъюгатов, способных расти на среде с сахарозой. В ПЦР использовали проверочные праймеры IGKF и IGKR. На первом этапе по удалению одной копии гена *iglC* из хромосомы туляремийного микроба было проанализировано 100 образцов ДНК клонов, из которых 6 давали ампликоны размером 545 п.о. и размером 1000 п.о., то есть содержали одну делеционную копию фрагмента хромосомы с геном *iglC* и одну природную копию. Для проведения второго этапа был взят один из 6 клонов, в клетки которого методом мобилизационного переноса была повторно введена плазида pPVΔ*iglC*. Среди 100 клонов, выросших на среде с сахарозой, 3 клон давали ампликоны размером только 545 п.о., то есть не со-

держали участков хромосомы с геном *iglC*. Сравнение роста отобранных колоний с бактериями штамма *F. tularensis* 503 на плотных и жидких питательных средах не выявило достоверных различий в размерах колоний через 48 ч роста и скорости роста в жидкой питательной среде (время удвоения ~ 2 ч). Для дальнейшего анализа был выбран один клон без двух копий гена *iglC*, обозначенный как *F. tularensis* 3m/23-2.

Определение выживаемости штамма *F. tularensis* 3m/23-2 в нормальной кроличьей сыворотке

Для изучения влияния продукта гена *iglC* на способность клеток природного и вакцинного штаммов выживать в НКС была проведена серия опытов по оценке устойчивости штаммов *F. tularensis* 3m/23-2 и 15/23-2 к НКС. В качестве контроля был использован штамм 15 НИИЭГ, а в качестве чувствительного к НКС – штамм 15 R. Бактерии штамма 15 НИИЭГ полностью сохраняли свою жизнеспособность в НКС, а бактерии штамма 15 R погибали. Модифицированные штаммы 3m/23-2 и 15/23-2 сохранялись в НКС так же, как и штамм 15 НИИЭГ. Полученные данные указывают на отсутствие влияния продукта гена *iglC* на способность бактерий *F. tularensis* выживать в НКС.

Фагоцитоз экспериментальных штаммов

Для изучения влияния продукта гена *iglC* на способность бактерий подвида *holarctica* проникать и размножаться в клетках мышинной макрофагоподобной линии J774A.1 и перитонеальных мышинных макрофагах была проведена серия опытов по фагоцитозу штаммов *F. tularensis* 3m/23-2 и 15/23-2. В качестве штамма сравнения был использован вакцинный штамм 15 НИИЭГ (рис. 1).

Штамм 3m/23-2 умеренно размножался в течение 24 ч как в клетках линии J774A.1, так и в перитонеальных мышинных макрофагах, однако уровень размножения был более чем на порядок ниже по сравнению с уровнем размножения бактерий штамма 15 НИИЭГ (см. рис. 1). Мутантный штамм 15/23-2, созданный на основе вакцинного штамма 15 НИИЭГ, практически не размножался в макрофагах. Из полученных данных следует, что: а) продукт гена *iglC* необходим для внутримакрофагального размножения вакцинного туляремийного штамма; б) модифицированный природный штамм содержит некие структуры или обладает механизмами, позволяющими компенсировать отсутствие продукта гена *iglC* для размножения в макрофагах.

Вирулентность штамма 3m/23-2

Подкожное введение мышам линии BALB/c и морским свинкам бактериальной суспензии штамма 3m/23-2 в дозах от 1×10^2 до 1×10^9 КОЕ не приводило к гибели животных за период наблюдения (30 дней). Для сравнения, в группе мышей линии BALB/c при подкожном введении вакцинного штамма 15 НИИЭГ в дозе 30 КОЕ и группе морских свинок при введении в дозе 1×10^9 КОЕ фиксировали гибель отдельных особей из групп.

Мыши линии C57BL/6 крайне чувствительны к бактериям туляремийного микроба. Они погибают от единичных клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [15]. Для проверки патогенных свойств штамма *F. tularensis* 3m/23-2 для

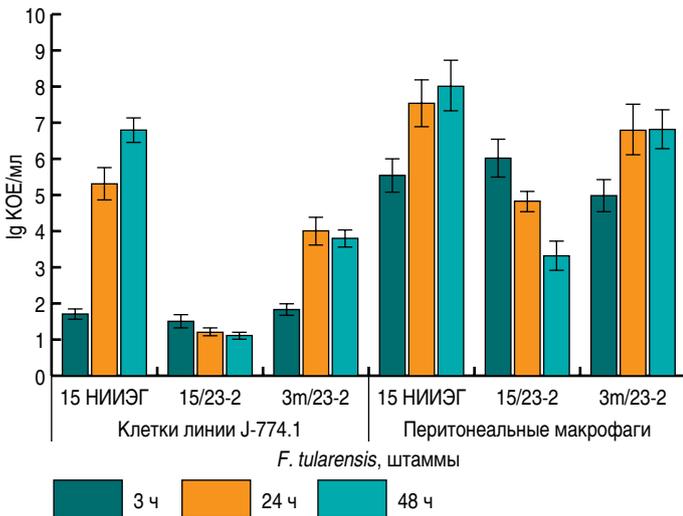


Рис. 1. Фагоцитоз штаммов *F. tularensis* в макрофагах. Высев бактерий проводили из 0,5 мл суспензии макрофагов, лизированных 0,05% раствором дезоксихолата натрия.

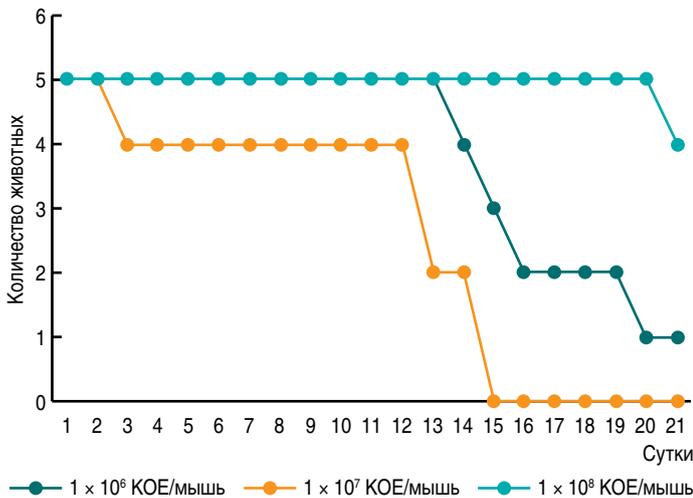


Рис. 2. Временная диаграмма сроков гибели животных.

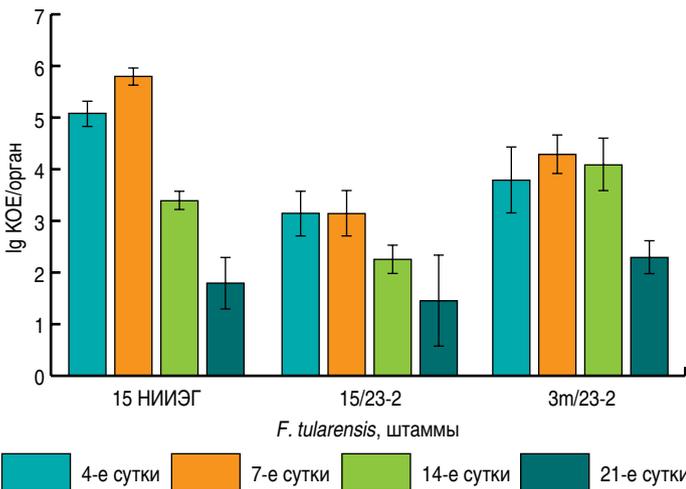


Рис. 3. Персистенция туляремийного микроба в селезенках мышей линии BALB/c. Группы мышей иммунизировали подкожно дозами 1×10^2 КОЕ штамма 15 НИИЭГ и 1×10^6 КОЕ штаммов 15/23-2 и 3m/23-2. Количество бактерий в селезенке определяли через 4, 7, 14 и 21 суток после инфицирования. Результаты показаны как значение Lg КОЕ/орган \pm доверительный интервал ($p < 0,05$).

данной высокочувствительной модели экспериментальной туляремии три группы мышей линии C57BL6 (по 5 особей в группе) заражали подкожно штаммом *F. tularensis* 3m/23-2 дозами 1×10^6 , 1×10^7 и 1×10^8 КОЕ/животное и наблюдали в течение 22 сут (рис. 2).

Мыши линии C57BL6 выживали при заражении штаммом *F. tularensis* 3m/23-2 дозами менее 1×10^4 КОЕ (данные не приведены), что указывает на его сниженную вирулентность по сравнению с вакцинным штаммом в данной модели туляремии. Другой особенностью штамма 3m/23-2 является тот факт, что при дозе заражения мышей линии C57BL6, равной 1×10^8 КОЕ/животное, 80% экспериментальных мышей остались живыми в течение 22 сут наблюдения, тогда как при дозе 1×10^7 КОЕ они погибали к 15-му дню наблюдения (рис. 2).

Делеция генов *iglC* из хромосомы *F. tularensis* подвида *holarctica* приводила к появлению практически авирулентного для мелких лабораторных животных штамма. Данный факт был отмечен ранее для вариантов вакцинного штамма 15 НИИЭГ и LVS без генов *iglC* [6, 8], что указывает на важную роль белка *IgIc* в патогенезе туляремийного микроба.

Персистенция штамма 3m/23-2 в селезенках лабораторных мышей

Хотя мыши линии BALB/c не погибали от высоких доз штамма, в органах животных обнаруживались живые бактерии туляремийного микроба. Данные по персистенции бактерий штамма 3m/23-2 в селезенках экспериментальных мышей, определенные через 4, 7, 14 и 21 сут после инфицирования, приведены на рисунке 3. Для сравнения на этом рисунке представлены результаты экспериментов по персистенции вакцинного штамма 15 НИИЭГ и его производного 15/23-2.

Из представленных данных видно, что удаление двух копий гена *iglC* из хромосомы штамма 503 приводило к потере способности бактерий размножаться в селезенке экспериментальных мышей, но при этом сохранялась способность модифицированного штамма диссеминировать от места введения возбудителя в селезенку, причем уровень обсемененности селезенки практически не менялся от 4 до 14 сут. К 21-му дню обсемененность снизилась на 2 порядка. Сходным образом диссеминировал и сохранялся в селезенке модифицированный вариант вакцинного штамма без двух копий гена *iglC*, однако степень диссеминации в данном случае была на порядок ниже, хотя двум группам мышей вводили одну и ту же дозу бактерий (1×10^6 КОЕ). В отличие от модифицированных штаммов у мышей, инфицированных штаммом 15 НИИЭГ, наблюдали как диссеминацию, так и размножение в селезенках. Максимальную обсемененность селезенки этой группы мышей наблюдали на 7-е сутки после заражения, затем количество бактерий снижалось и к 21-м суткам падало на 4 порядка относительно максимального уровня. В отличие от штаммов 15 НИИЭГ и 15/23-2, единичные живые бактерии штамма *F. tularensis* 3m/23-2 обнаруживали в селезенках мышей вплоть до 64-го дня.

При высевах на твердую питательную среду гомогената селезенки выживших мышей линии C57BL6, иммунизированных дозой 1×10^8 КОЕ, было выявлено, что все селе-

Свойства бактерий *F. tularensis subsp. holarctica*, лишенных способности синтезировать белок IgG

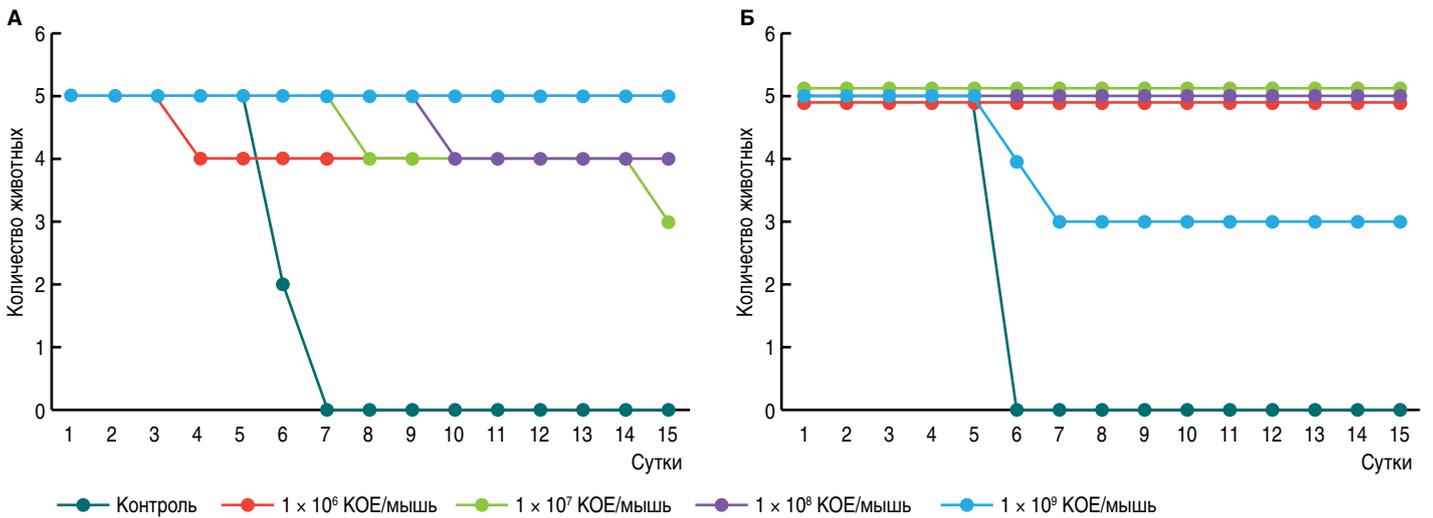


Рис. 4. Протективность штамма *F. tularensis* 3m/23-2 для аутбредных мышей. Группы мышей (по 5 особей) иммунизировали подкожно дозами от 1×10^6 до 1×10^9 КОЕ/мышь. Для заражения использовали штамм *F. tularensis* 503 в дозах: А – 30 КОЕ, Б – 3000 КОЕ.

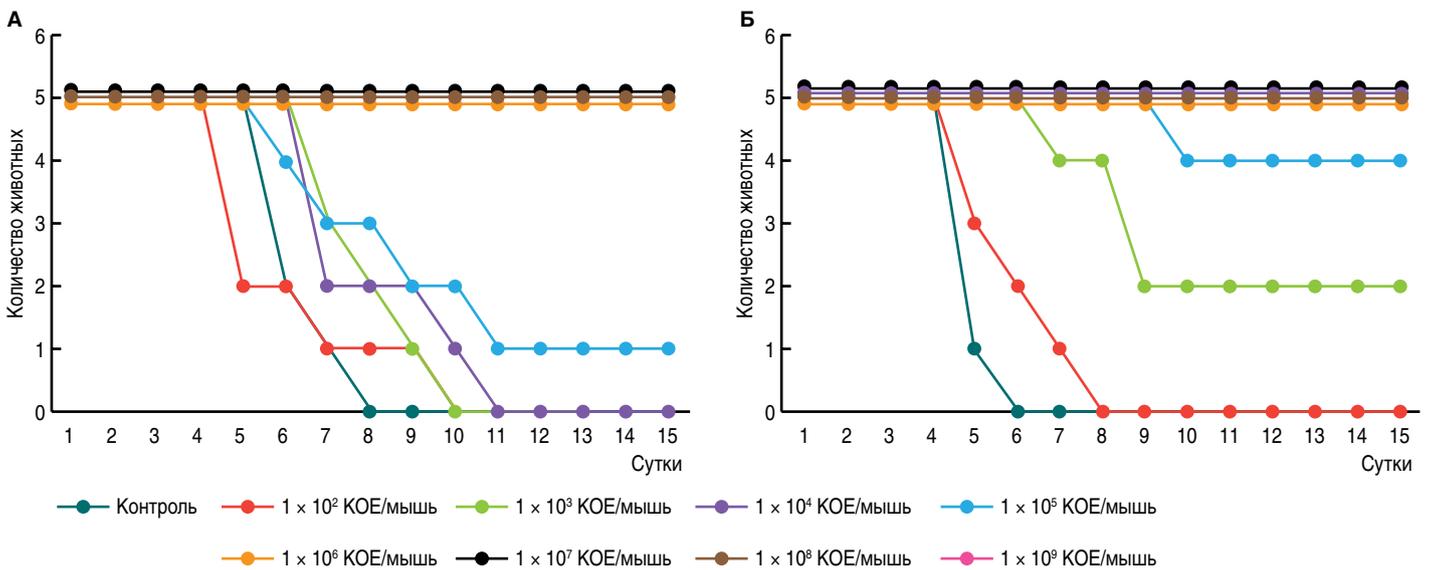


Рис. 5. Протективность штамма *F. tularensis* 3m/23-2 для мышей линии BALB/c. Группы мышей (по 5 особей) иммунизировали подкожно дозами от 1×10^2 до 1×10^9 КОЕ/мышь. Для заражения использовали штаммы *F. tularensis* Schu (А) и 503 (Б) 503 в дозе 1×10^3 КОЕ.

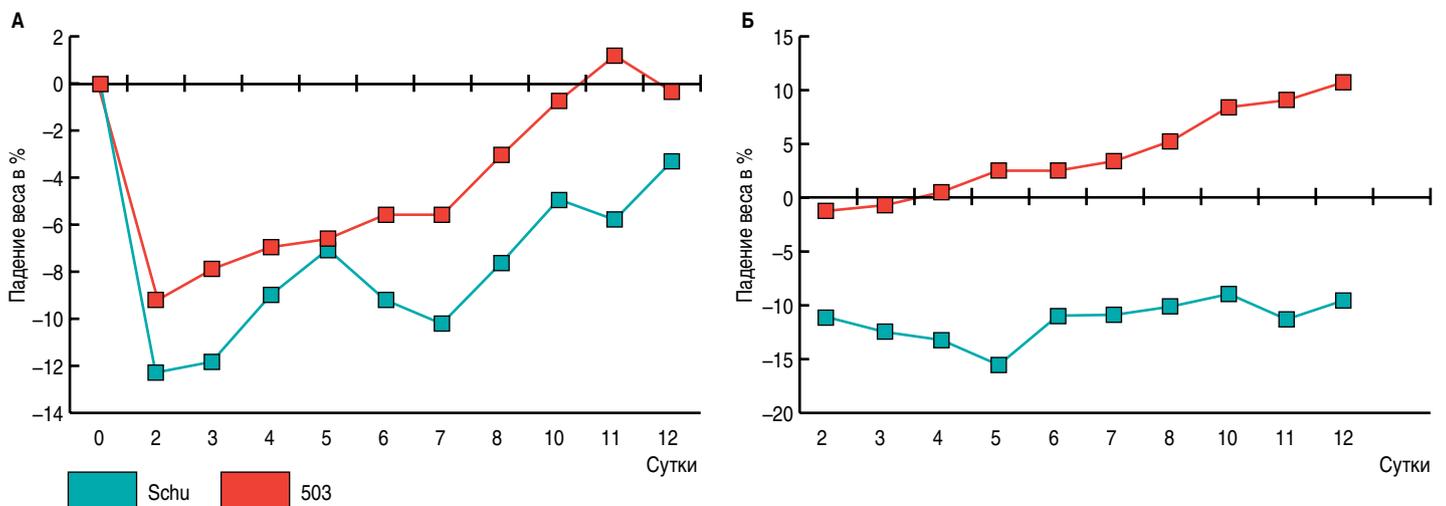


Рис. 6. Изменения веса иммунных мышей линии BALB/c после заражения штаммами 503 и Schu. Для иммунизации групп мышей использовали штамм *F. tularensis* 3m/23-2 в дозе 1×10^6 КОЕ (А) и штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 22 КОЕ (Б).

зенки содержали бактерии заражающего штамма. Среднее количество клеток возбудителя в селезенках было $(2 \pm 0,5) \times 10^4$ КОЕ/орган. Для сравнения, группа мышей линии C57BL6, иммунизированных штаммом 15/23-2 дозой 1×10^8 КОЕ, к 22-м суткам не содержала в селезенках клеток туляремийного микроба.

Протективные свойства штамма 3m/23-2

Группы морских свинок, иммунизированных штаммом 3m/23-2 дозами 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 КОЕ/животное подкожно, были полностью защищены от последующего подкожного заражения 3×10^3 КОЕ вирулентного штамма 503. В контрольной группе морских свинок все животные погибли от той же дозы возбудителя туляремии. Животные погибали с 6-е по 12-е сутки.

Протективные свойства штамма 3m/23-2 были изучены на аутбредных мышах (рис. 4) и мышах линии BALB/c (рис. 5).

Четыре группы аутбредных мышей (по 5 особей в группе) иммунизировали подкожно дозами 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 КОЕ/мышь соответственно. Через 28 сут после иммунизации они были заражены подкожно вирулентным штаммом *F. tularensis* 503 дозами 30 и 3000 КОЕ/животное. Иммунизированные животные были полностью защищены от дозы 30 КОЕ, если они были иммунизированы штаммом 3m/23-2 в дозе 1×10^9 КОЕ, и защищены только частично при меньших дозах иммунизации (рис. 4А). Иную картину наблюдали, когда для заражения использовали дозу 3000 КОЕ. Иммунизированные мыши (дозы иммунизации от 1×10^6 до 1×10^8) были полностью защищены от гибели, а мыши, иммунизированные дозой 1×10^9 КОЕ, были защищены только частично (рис. 4Б).

Делеционный вариант вакцинного штамма 15 НИИЭГ без обеих копий гена *iglC* был не способен формировать у белых мышей защиту от последующего заражения штаммом 503 [8].

В экспериментах по заражению групп линейных мышей BALB/c, предварительно иммунизированных штаммом *F. tularensis* 3m/23-2, вирулентными штаммами двух подвигов: *subsp. holarctica* (штамм 503) и *subsp. tularensis* (штамм Schu), были получены данные о различной зависимости протективности изучаемого штамма от дозы иммунизации при последующем подкожном заражении штаммами 503 и Schu (рис. 5А, Б).

Из рисунка 5 видно, что введение мышам 1×10^3 КОЕ бактерий штамма Schu приводило к гибели более половины животных, если они были предварительно иммунизированы дозами менее 1×10^6 КОЕ, тогда как при заражении штаммом 503 такую гибель наблюдали при дозах иммунизации менее 1×10^5 КОЕ.

Иммунизированные животные по-разному реагировали на заражение штаммами 503 и Schu. Динамика изменения веса экспериментальных мышей (рис. 6А) указывает на более тяжелый инфекционный процесс у животных, зараженных штаммом Schu, по сравнению со штаммом 503. Сходную картину наблюдали и для групп животных, предварительно иммунизированных вакцинным штаммом (рис. 6Б).

Созданный в данной работе штамм *F. tularensis subsp. holarctica* 3m/23-2 без двух копий гена *iglC* практически авирулентен для лабораторных животных (мышей и морских свинок). Однако клетки данного штамма сохраняют жизне-

способность при 18-часовой инкубации в НКС и умеренно размножаются как в макрофагоподобных клетках линии J771.A1, так и в перитонеальных макрофагах. Свойства мутантного штамма 15/23-2 без двух копий гена *iglC*, созданного на основе вакцинного штамма 15 НИИЭГ, также относящегося к подвиду *holarctica*, практически не отличаются от свойств штамма 3m/23-2, за исключением полной потери способности к внутримакрофагальному размножению. Полученные результаты указывают на критичность неограниченной способности бактерий размножаться в макрофагах для вирулентности *F. tularensis*. Можно также предположить, что повышенная способность бактерий вакцинного штамма 15 НИИЭГ размножаться в макрофагах по сравнению с бактериями штамма 3m/23-2 объясняет их остаточную вирулентность для экспериментальных мышей.

Иммунизация мышей линии BALB/c штаммом 3m/23-2 приводит к формированию определенной протективности экспериментальных животных к последующему заражению вирулентными штаммами как подвида *holarctica*, так и подвида *tularensis*. Штаммы *F. tularensis subsp. holarctica* LVS и 15 НИИЭГ, а также и *F. tularensis subsp. tularensis* Schu без обеих копий гена *iglC*, в отличие от штамма *F. tularensis subsp. holarctica* 3m/23-2, потеряли данную способность [6, 7, 8].

Интересен факт, что дозы иммунизации мышей штаммом 3m/23-2, необходимые для защиты животных от последующего заражения штаммами Schu (*subsp. tularensis*) и 503 (*subsp. holarctica*), отличаются на два порядка. Вероятно, это связано с необходимостью более выраженного гуморального иммунного ответа для защиты животных от бактерий подвида *tularensis*.

Мутантный штамм подвида *tularensis* без двух копий гена *iglC* Schu S4 Δ *iglC*, полученный на основе штамма *F. tularensis* Schu S4, при подкожном введении дозы 1×10^6 КОЕ персистирует в зоне введения, но внутрикожная иммунизация этим штаммом, в отличие от иммунизации LVS, удлиняет только на 2 дня время жизни экспериментальных мышей линии BALB/c после подкожного заражения дозой 500 КОЕ высоковирулентного штамма подвида *tularensis* [7]. Внутрикожная иммунизация другим авирулентным вариантом Schu S4 с делетированным опероном *pur* (Schu S4 Δ *purMCD*) приводила также только к удлинению сроков жизни животных на 2,6 дня при интраназальном заражении дозой 500 КОЕ штамма Schu S4 [17].

Таким образом, полученные нами данные указывают на способность аттенуированных в результате делеции генов *iglC* штаммов подвида *holarctica* формировать протективный иммунитет на мышинной модели экспериментальной туляремии, тогда как, по литературным данным, аттенуированные штаммы подвида *tularensis* такими свойствами не обладают.

Работа выполнена в рамках НИР 048 «Изучение механизмов патогенеза и иммуногенеза туляремийной инфекции и мониторинг за циркуляцией возбудителя в отдельных регионах Российской Федерации» Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемноориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

Литература

- Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun*. 2005 Sep;73(9):5892-902. DOI: 10.1128/IAI.73.9.5892-5902.2005
- Bröms JE, Sjöstedt A, Lavander M. The role of the *Francisella tularensis* pathogenicity island in type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling. *Front Microbiol*. 2010 Dec 21;1:136. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00136
- Lai XH, Sjöstedt A. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect Immun*. 2003 Aug;71(8):4642-6.
- Checroun C, Wehrly TD, Fischer ER, Hayes SF, Celli J. Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 26;103(39):14578-83.
- Barker JR, Klose KE. Molecular and Genetic Basis of Pathogenesis in *Francisella tularensis*. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jun;1105:138-59. DOI: 10.1196/annals.1409.010
- Golovliov I, Sjöstedt A, Mokrievich A, Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 May 28;222(2):273-80.
- Twine S, Byström M, Chen W, Forsman M, Golovliov I, Johansson A, et al. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):8345-52. DOI: 10.1128/IAI.73.12.8345-8352.2005
- Мокриевич АН, Вахрамеева ГМ, Миронова РИ, Комбарова ТИ, Титарева ГМ, Кравченко ТБ, и др. Создание и изучение вариантов вакцинного штамма *Francisella tularensis* без генов igIC. Сообщение 2. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;4(118):102-5. DOI:10.21055/0370-1069-2013-4-102-105
- Мокриевич АН, Вахрамеева ГМ, Миронова РИ, Комбарова ТИ, Титарева ГМ, Кравченко ТБ, и др. Создание и изучение вариантов вакцинного штамма *Francisella tularensis* без генов igIC. Сообщение 1. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;3(117):70-4. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-3-70-74
- Miller JH. *Experiments in Molecular Genetics*. Gold Spring Harbor Lab., Gold Spring Harbor, New York, 1972, 466 p.
- Лапин АА, Павлов ВМ, Мокриевич АН, Домотенко ЛВ, Храмов МВ. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2009;4(102):66-7.
- Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 №18713) 2010, 22 с.
- Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2010, 48 с.
- Ашмарин ИП, Воробьев АА. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962, 180 с.
- Комбарова ТИ, Павлов ВМ, Кравченко ТБ, Титарева ГМ, Бахтеева ИВ, Борзилов АИ, и др. Сравнительная оценка реактогенности туляремийной вакцины на различных биомоделях. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013;4(71):54-62.
- Lauriano CM, Barker JR, Nano FE, Arulanandam BP, Klose KE. Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Dec 12;229(2):195-202.
- Pechous RD, McCarthy TR, Mohapatra NP, Soni S, Penoske RM, Salzman NH, et al. A *Francisella tularensis* Schu S4 purine auxotroph is highly attenuated in mice but offers limited protection against homologous intranasal challenge. *PLoS One*. 2008 Jun 25;3(6):e2487. DOI: 10.1371/journal.pone.0002487
- Bröms JE, Sjöstedt A, Lavander M. The role of the *Francisella tularensis* pathogenicity island in type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling. *Front Microbiol*. 2010 Dec 21;1:136. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00136
- Lai XH, Sjöstedt A. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect Immun*. 2003 Aug;71(8):4642-6.
- Checroun C, Wehrly TD, Fischer ER, Hayes SF, Celli J. Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 26;103(39):14578-83.
- Barker JR, Klose KE. Molecular and Genetic Basis of Pathogenesis in *Francisella tularensis*. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jun;1105:138-59. DOI: 10.1196/annals.1409.010
- Golovliov I, Sjöstedt A, Mokrievich A, Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 May 28;222(2):273-80.
- Twine S, Byström M, Chen W, Forsman M, Golovliov I, Johansson A, et al. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):8345-52. DOI: 10.1128/IAI.73.12.8345-8352.2005
- Мокриевич АН, Вахрамеева ГМ, Миронова РИ, Комбарова ТИ, Титарева ГМ, Кравченко ТБ, и др. Создание и изучение вариантов вакцинного штамма *Francisella tularensis* без генов igIC. Сообщение 2. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;4(118):102-5. DOI:10.21055/0370-1069-2013-4-102-105
- Мокриевич АН, Вахрамеева ГМ, Миронова РИ, Комбарова ТИ, Титарева ГМ, Кравченко ТБ, и др. Создание и изучение вариантов вакцинного штамма *Francisella tularensis* без генов igIC. Сообщение 1. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;3(117):70-4. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-3-70-74
- Miller JH. *Experiments in Molecular Genetics*. Gold Spring Harbor Lab., Gold Spring Harbor, New York, 1972, 466 p.
- Лапин АА, Павлов ВМ, Мокриевич АН, Домотенко ЛВ, Храмов МВ. Simple Liquid Nutrient Medium for Molecular Genetic Investigations of *Francisella tularensis*. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2009;4(102):66-7. (In Russian).
- 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).
- 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).
- Ashmarin IP, Vorob'ev AA. *Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh* [Statistical methods in microbiological research]. L.: Mesgiz "Publ.", 1962, 180 p. (In Russian).
- Комбарова ТИ, Павлов ВМ, Кравченко ТБ, Титарева ГМ, Бахтеева ИВ, Борзилов АИ, et al. Comparative Evaluation of Reactogenicity Tularemia Vaccine Using of Different Biomodels. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2013;4(71):54-62. (In Russian).
- Lauriano CM, Barker JR, Nano FE, Arulanandam BP, Klose KE. Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Dec 12;229(2):195-202.
- Pechous RD, McCarthy TR, Mohapatra NP, Soni S, Penoske RM, Salzman NH, et al. A *Francisella tularensis* Schu S4 purine auxotroph is highly attenuated in mice but offers limited protection against homologous intranasal challenge. *PLoS One*. 2008 Jun 25;3(6):e2487. DOI: 10.1371/journal.pone.0002487

References

Информация об авторах:

Павлов Виталий Михайлович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии туляремии отдела 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

- Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun*. 2005 Sep;73(9):5892-902. DOI: 10.1128/IAI.73.9.5892-5902.2005

Вахрамеева Галина Михайловна, 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

Миронова Раиса Ивановна, 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

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

Бахтеева Ирина Викторовна, кандидат медицинских 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

Титарева Галина Михайловна, кандидат медицинских 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

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

Information about authors:

Vitaliy M. Pavlov, MD, PhD, DSc, head of the laboratory of microbiology of tularemia 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

Galina M. Vakhrameeva, 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

Raisa I. Mironova, 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 I. Kombarova, PhD (Biol), senior researcher of the biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Irina V. Bakhteeva, MD, 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

Galina M. Titareva, MD, 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

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med), Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

НОВОСТИ НАУКИ

Недопустимы никакие контакты и распространения

Clostridium difficile – это бактерия, которая может вызвать сильный понос за счет выработки токсинов. Ученые из Техасского Университета, США, открыли путь, посредством которого гены бактерии совместно нарабатывают эти токсины. По мере того, как *C. difficile* становится все более и более устойчивой к нынешнему поколению антибиотиков, это открытие может потенциально привести к появлению новых методов лечения вызванных микробом инфекций, таких как предотвращение совместно работающих генов и избавление их от способности продуцировать вызывающие болезнь токсины.

Darkoh C. et al. 2016.

Accessory Gene Regulator-1 Locus Is Essential for Virulence and Pathogenesis of Clostridium difficile.
mBio 7, e01237-16. DOI: 10.1128/mBio.01237-16

Война бактерий и людей

На фестивале науки «Кстати», организованном новосибирским Информационным центром по атомной энергии, известный российский биоинформатик, заместитель директора Института проблем передачи информации имени А.А.Харкевича РАН доктор биологических наук Михаил Сергеевич Гельфанд прокомментировал это документальное кино, а также рассказал, насколько реальна угроза устойчивости бактерий к антибиотикам.

Наука в Сибири. Война бактерий и людей. Наука в Сибири [Электронный ресурс].
URL: <http://www.sbras.info/articles/simply/voina-bakterii-i-lyudei>.

Влияние генетической характеристики *Helicobacter pylori* на воспалительный процесс в слизистой оболочке верхних отделов пищеварительного тракта детей с хроническим гастритом

Е.М.Спивак¹, Р.М.Левит¹, Г.В.Кузьмина², М.Ю.Деменчук²

¹ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет», Ярославль, Российская Федерация;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской области», Ярославль, Российская Федерация

Целью работы было установить особенности клинических, эндоскопических проявлений и патоморфологии слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки при *Hp*-ассоциированном хроническом гастрите у детей в зависимости от генетической характеристики *Helicobacter pylori* (*Hp*). Обследовано 96 детей в возрасте 12–17 лет с хроническим *Hp*-ассоциированным гастритом. Анализировали клинические проявления заболевания, эндоскопические и морфологические параметры слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки в сопоставлении с генетической характеристикой *Hp*. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в материале гистобиоптатов определяли штаммы *Hp*, имеющие факторы патогенности *VacA*, *CagA*, *IceA*, *BabA*, а также субъединицу уреазы *UreI*. Различий в клинических проявлениях хронического гастрита, ассоциированного с различными штаммами *Hp*, не выявлено. Одновременно установлено, что колонизация слизистой оболочки желудка штаммами *Hp* с генетической структурой, содержащей факторы патогенности *UreI*, *CagA*, *VacA*, *BabA*, *IceA*, при хроническом *Hp*-ассоциированном гастрите у детей является фактором усиления и увеличения распространенности воспалительного процесса, появления эндоскопических и морфологических признаков атрофии. Наибольшее влияние на указанные показатели оказывает присутствие в геноме микроорганизма *CagA*. Выраженность и активность воспаления значительно нарастают при сочетании в геноме *Hp* нескольких факторов патогенности.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, факторы патогенности, хронический гастрит, дети

Для цитирования: Спивак Е.М., Левит Р.М., Кузьмина Г.В., Деменчук М.Ю. Влияние генетической характеристики *Helicobacter pylori* на воспалительный процесс в слизистой оболочке верхних отделов пищеварительного тракта детей с хроническим гастритом. Бактериология. 2017; 2(4): 25–29. DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-25-29

The influence of genetic features of *Helicobacter pylori* on the inflammatory process in the mucosa of the upper digestive tract of children with chronic gastritis

Е.М.Spivak¹, R.M.Levit¹, G.V.Kuzmina², M.Yu.Demenchuk²

¹Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation;

²Center of Hygiene and Epidemiology in Yaroslavl region, Yaroslavl, Russian Federation

The aim of this work is to characterize the clinical, endoscopic manifestations and pathomorphology of the gastric and duodenal mucosa in *Hp*-associated chronic gastritis in children depending on the genetic characteristics of *Helicobacter pylori*. The study included 96 children aged 12–17 years with chronic *Hp*-associated gastritis. Clinical manifestations, endoscopic and morphological parameters of the gastric and duodenum mucosa in comparison with the genetic characteristics of *Hp* have been analyzed. *Hp* strains having the pathogenicity factors *VacA*, *CagA*, *IceA*, *BabA*, as well as the subunit urease *UreI* were determined by the PCR method in the material of gastrobiopsies. There were no differences in clinical manifestations of chronic gastritis associated with different *Hp* strains. It also has been established that colonization of the gastric mucosa by *Hp* strains with a genetic structure containing the virulence factors *UreI*, *CagA*, *VacA*, *BabA* and *IceA* in chronic *Hp*-associated gastritis in children is increasing and increasing prevalence of the inflammatory process, the appearance of endoscopic and morphological signs of atrophy. The presence of the *CagA* factor in the genome of the microorganism has the greatest impact on these indicators. The manifestation and activity of inflammation increases significantly under combination of several *Hp* virulence factors in the genome.

Keywords: *Helicobacter pylori*, virulence factors, chronic gastritis, children

For citation: Spivak E.M., Levit R.M., Kuzmina G.V., Demenchuk M.Yu. The influence of genetic features of *Helicobacter pylori* on the inflammatory process in the mucosa of the upper digestive tract of children with chronic gastritis. Bacteriology. 2017; 2(4): 25–29. (In Russian). DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-25-29

Для корреспонденции:

Спивак Евгений Маркович, доктор медицинских наук, профессор кафедры факультетской педиатрии с пропедевтикой детских болезней ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет»

Адрес: 150054, Ярославль, ул. Революционная, 5

Телефон: (4852) 30-5641

E-mail: spivak58@mail.ru

Статья поступила 24.10.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Evgeny M. Spivak, MD, PhD, DSc, professor, of the department of faculty pediatrics with the propaedeutics childhood diseases, Yaroslavl State Medical University

Address: 5 Revoliutsionnaya str., Yaroslavl, 150054, Russian Federation

Phone: (4852) 30-5641

E-mail: spivak58@mail.ru

The article was received 24.10.2017, accepted for publication 22.12.2017

В настоящее время бактерия *Helicobacter pylori* (*Hp*) признана ведущим этиологическим фактором хронической воспалительной патологии верхних отделов пищеварительного тракта во всех возрастных группах, в том числе у детей [1–3]. Установлено, что при высоких показателях распространенности *Hp* среди детей на территории Российской Федерации *Hp*-ассоциированные гастродуоденальные заболевания развиваются лишь у небольшой части инфицированных. Клинические проявления пилорического хеликобактериоза у детей весьма вариабельны: бессимптомное бактерионосительство, хроническая воспалительная патология различной выраженности, язвенная болезнь [4, 5].

Доказано, что *Hp* свойственен значительный генетический полиморфизм, что определяет ее вирулентность и патогенность; данная бактерия выступает в качестве патогена, комменсала или сапрофита [6, 7]. Молекулярно-генетические особенности инфекта могут оказывать существенное влияние на характер изменений слизистой оболочки верхних отделов пищеварительного тракта, а следовательно, на развитие, течение, прогноз гастродуоденальной патологии, а также эффективность терапии [3].

В настоящее время в соответствии с действующими консенсусами выявление *Hp* в абсолютном большинстве случаев автоматически ведет к назначению антихеликобактерного лечения. Однако в тех случаях, когда слизистая оболочка желудка колонизирована слабопатогенными штаммами *Hp* и отсутствуют выраженные клинико-эндоскопические и морфологические изменения, использование стандартных эрадикационных схем далеко не всегда может считаться оправданным [8]. Все вышеперечисленное обуславливает важность изучения молекулярно-генетической структуры *Hp* при *Hp*-ассоциированных заболеваниях желудка и двенадцатиперстной кишки. Применительно к пациентам детского возраста этот вопрос является малоисследованным, что затрудняет разработку новых подходов к терапии указанной патологии.

Цель настоящей работы – установить особенности клинических, эндоскопических проявлений и патоморфологии слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки при *Hp*-ассоциированном хроническом гастрите у детей в зависимости от генетической характеристики *Helicobacter pylori*.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили данные обследования 96 детей в возрасте от 12 до 17 лет (в среднем $15,1 \pm 0,4$), в том числе 44 мальчиков и 52 девочек, которым в условиях специализированного гастроэнтерологического стационара верифицирован диагноз «хронический гастрит» (ХГ).

Дизайн работы предусматривал анализ клинических данных с детальной характеристикой симптоматики ХГ: абдоминального болевая, диспепсического, астеновегетативного и интоксикационного синдромов. Во всех случаях проводилась эзофагогастродуоденоскопия с последующим морфологическим исследованием биопсийного материала слизистой оболочки желудка (СОЖ) и двенадцатиперстной кишки

(ДПК). Выявление *Helicobacter pylori* осуществлялась с помощью трех методик:

1. уреазный тест с определением в биопсийном материале специфической уреазной активности, обусловленной присутствием инфекта (производитель НИИ ЭКФ, г. Санкт-Петербург);

2. гистологический метод: окраска бактерий по Романовскому-Гимзе с последующей оценкой степени обсемененности *Helicobacter pylori* (незначительная, умеренная и выраженная) в соответствии со стандартной визуально-аналоговой шкалой;

3. обнаружение ДНК инфекта в биоптатах с помощью ПЦР (тест-система фирмы «ДНК-Технология», Москва).

Для типирования штамма *Helicobacter pylori* использовали метод ПЦР с применением тест-систем фирм «Синтол» и «Литех» (Москва). В материале гастробиоптатов определяли присутствие штаммов *Hp*, имеющих следующие факторы патогенности: *VacA* (вакуолизирующий цитотоксин), *CagA* (продукт одного из генов «островка патогенности»); *IceA* (фактор, индуцирующий контакт *Hp* с эпителием); *BabA* (адгезин к Leb-антигенам групп крови); субъединицу уреазы *UreI*.

Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ «StatPlus 2009». Для оценки взаимосвязей использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Значимость различий относительных величин определяли с помощью углового преобразования Фишера. Пороговой величиной статистической достоверности цифровых данных являлся уровень $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При типировании *Hp* более чем у половины детей с ХГ (55,2%) определялось наличие высокопатогенных штаммов инфекта. Частота регистрации отдельных факторов патогенности *Hp* представлена в таблице 1.

Важнейшей характеристикой *Hp* является способность вырабатывать уреазу, что дает возможность микроорганизму выживать в неблагоприятной для него кислой среде желудка. В настоящее время описано 7 генов, кодирующих синтез этого фермента. Гены *ureA* и *ureB* обеспечивают структурные субъединицы фермента, *ureA* стимулирует NO-синтазу, катализирующую реакцию образования NO – одного из универсальных факторов воспаления, *ureB* способствует хемотаксису лейкоцитов. Таким образом, усиливается воспалительный процесс в СОЖ. Гены *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH* кодируют формирование дополнительных белков, необходимых для сборки молекулы и включения в нее молекул никеля. Особую роль играет ген *ureI*, который обеспечивает образование специального канала для водородных ионов. Именно через него идет транспорт мочевины в цитоплазму *Hp*, где она в последующем гидролизруется [9]. Следовательно, *ureI* можно считать одним из факторов высокой патогенности инфекта. Среди наших пациентов штаммы, содержащие *ureI*, выявлены в 37,8% случаев.

Основным маркером островка патогенности *Hp* считается ген *cagA*, в связи с чем штаммы бактерии подразделяются на *cagA+* (позитивные) и *cagA-* (негативные). *CagA* рассматривают как специфический ген, который появился в связи с

колонизацией *Hp* организма человека. Он кодирует синтез критического иммунодоминантного белка – одного из главных факторов патогенности *Hp*. Биологические эффекты *CagA* многообразны. Он непосредственно участвует в нарушении целостности эпителиального покрова СОЖ, индуцирует нарушение процессов клеточного обновления в ней в виде неконтролируемой пролиферации эпителиоцитов и лимфоидных клеток, участвует в секреции провоспалительных цитокинов и в формировании, таким образом, хронической воспалительной реакции [10, 11]. В островке патогенности *Hp* имеются белки особой секреторной системы, которая осуществляет транспортировку эффекторных молекул инфекта в эпителиоциты СОЖ. Эти протеины строят специфическую шприцеобразную структуру, посредством которой происходит проникновение *CagA* в клетки хозяина, где он подвергается фосфорилированию. Фосфорилирование, в свою очередь, приводит к изменению цитоскелета эпителиоцитов, в результате чего в них происходят морфологические изменения, а также к уменьшению подвижности клетки, что замедляет процессы регенерации эпителия. Под влиянием *CagA* в эпителии активируются клеточная пролиферация и апоптоз, стимулируется выработка интерлейкинов [6, 10–12].

Нами установлено, что доля *cagA*-позитивных штаммов *Hp* у детей с хроническим *Hp*-ассоциированным гастритом составила 27,1%. С сопоставимой частотой (32,3%) обнаруживался ген *vacA*, который кодирует синтез вакуолизирующего цитотоксина. Продукт этого гена, белок *VacA*, вызывает образование вакуолей в эпителиоцитах СОЖ, это воздействует на АТФ-азу V типа, создавая тем самым кислую внутриклеточную среду, что способствует накоплению внутри клетки аммиака и других осмотически активных веществ. В результате вакуоли набухают, сливаются друг с другом, в итоге происходит разрыв цитоплазматической мембраны и гибель клетки [10]. Другими неблагоприятными эффектами этого токсина являются ингибирование секреции хлороводородной кислоты в париетальных клетках, увеличение синтеза пепсиногена в главных клетках, угнетение расщепляющей способности эндосом и лизосом, клеточной пролиферации, повреждение митохондрий, нарушение презентации антигенов. Между *CagA* и *VacA* генотипами *Hp* существует ассоциация, поэтому большинство *VacA*-штаммов являются *CagA*+. Это дает основание полагать, что *VacA* служит не самостоятельным, а скорее, дополнительным фактором патогенности *Hp* [3, 7].

Необходимым условием реализации патогенного эффекта *Hp* можно считать его способность фиксироваться на клетках покровного эпителия. Адгезия бактерии резко снижает возможность ее элиминации из организма. Она осуществляется за счет взаимодействия между лигандами *Hp* и соответствующими рецепторами на цитоплазматической мембране клеток СОЖ. Этот процесс находится под контролем специального гена *babA*. Он кодирует образование одноименного протеина, который является посредником сцепления между антигенами Lewis b на эпителиальных клетках СОЖ и *Hp* [13, 14].

По нашим данным, доля *BabA*-позитивных пациентов в группе детей с ХГ составила 12,5%.

Еще одним фактором патогенности *Hp* служит ген цитотоксичности *iceA*, который активируется при контакте ин-

Таблица 1. Частота выявления факторов патогенности *Helicobacter pylori* при хроническом *Hp*-ассоциированном гастрите у детей

Фактор патогенности <i>Hp</i>	Частота встречаемости, %
Urel	34,4
CagA	27,1
VacA	32,3
IceA	25,0
BabA	12,5

фекта с эпителием СОЖ. Выделяют 2 аллельные формы гена: *iceA1* и *iceA2*. При этом инфицирование *IceA1* сопровождается большей степенью инфильтрации собственной пластинки СОЖ полиморфноядерными нейтрофилами. Доказано также, что *IceA*, наряду с *BabA*, индуцирует адгезию *Hp* к эпителиоцитам СОЖ человека [15]. Среди детей с ХГ, включенных в настоящее исследование, *IceA*-позитивным был каждый четвертый больной (25%).

Все обследованные дети были распределены на 2 группы. Первую из них (основную) составили 53 пациента, у которых выявлены высокопатогенные штаммы *Hp*. В большинстве случаев (66%) зафиксировано сочетание нескольких изучаемых факторов патогенности *Hp* (от 2 до 5). Во вторую группу (сравнения) включены 43 ребенка с ХГ, ассоциированным со штаммами *Hp*, в геноме которых исследуемые факторы патогенности отсутствовали.

Сравнение клинических проявлений ХГ в выделенных группах больных не выявило значимых различий, что указывает на отсутствие каких-либо специфических клинических проявлений заболевания, зависящих от генетической характеристики *Hp*.

Одновременно нами получены статистически достоверные межгрупповые различия в эндоскопической картине СОЖ и ДПК. Установлено, что колонизация СОЖ высокопатогенными штаммами *Hp* приводит к расширению зоны ее повреждения. Хроническое воспаление в субкардии регистрировалось у 24,5% пациентов основной группы против 7% в группе сравнения ($p < 0,05$), а пангастрит у них выявлялся более чем в 3 раза чаще (34% против 9,3%, $p < 0,01$). Макроскопически воспаление в СОЖ, вызванное высокопатогенными штаммами *Hp*, характеризуется следующими особенностями: практически у каждого второго пациента (47,2%) имеет место выраженный процесс: в большинстве случаев (79,2%) гиперпластический, у 22,6% из них выявляются визуальные признаки атрофии. У детей из группы сравнения, напротив, преобладает умеренное или незначительное воспаление (83,7%), чаще поверхностное (55,8%), проявления атрофического процесса регистрируются в единичных случаях (4,8%, $p < 0,05$). Макроскопические признаки выраженного дуоденита значительно чаще фиксировались в основной группе (67,9% против 27,9%, $p < 0,005$); фолликулярного бульбита (17% против 4,8%, $p < 0,05$).

При оценке морфологических характеристик хронического воспаления в СОЖ обнаружено, что колонизация ее высокопатогенными штаммами *Hp* коррелирует с более выраженным показателем обсемененности. Так, в группе сравнения у каждого второго пациента (51,2%) она была незначительной, тогда как в основной группе доминировали случаи умеренной и высокой обсемененности (суммарно 79,2%). Большая выраженность и активность воспалительного про-

Таблица 2. Выраженность хронического воспаления СОЖ у детей ХГ (%)

Выраженность хронического воспаления в СОЖ	Группы пациентов сравнения		Достоверность различий (p)
	основная	основная	
Степень воспаления в теле желудка			
Начальная	82,9	53,0*	<0,05
Умеренная	12,2	30,6*	<0,05
Выраженная	4,9	16,4	>0,05
Степень воспаления в антральном отделе желудка			
Начальная	80,4	28,6*	<0,005
Умеренная	7,4	22,4*	<0,05
Выраженная	12,2	49,0*	<0,005

Примечание: * – различия достоверны.

цесса у детей основной группы (табл. 2) подтверждались высокой частотой обнаружения у них микроэрозий (34% против 14%, $p < 0,05$) и лимфоидных фолликулов (41,5% против 16,2, $p < 0,01$) при морфологическом исследовании гастробиоптатов.

Корреляционный анализ позволил установить, что наиболее сильное влияние на выраженность воспаления в слизистой оболочке как тела желудка, так и антрального отдела оказывает наличие гена *cagA*. Присутствие этого фактора патогенности положительно коррелирует со всеми показателями воспалительного процесса: выраженностью ($R = +0,42$, $p < 0,001$), активностью ($R = 0,35$, $p < 0,01$), признаками атрофии ($R = +0,35$, $p < 0,001$), микроэрозиями ($R = +0,34$, $p < 0,001$) и лимфоидными фолликулами ($R = +0,32$, $p < 0,01$). Наличие других факторов патогенности в геноме *Hp* также прямо коррелирует со степенью хронического воспаления в СОЖ. Одновременное присутствие нескольких из них увеличивает тесноту этой взаимосвязи: значения коэффициента Спирмена возрастают до +0,57.

Установлено, что комбинация (*cagA + vacA + baba2*), названная триплексом генов, у взрослых пациентов ассоциируется с большей выраженностью воспаления в СОЖ, высоким риском развития в ней эрозивно-язвенных процессов, интестинальной метаплазии, а также аденокарциномы желудка [16–18]. Мы наблюдали двух пациентов с геномом *Hp*, включавшим *CagA + VacA + BabA*; в обоих случаях имела место максимальная выраженность и активность процесса в СОЖ, а также признаки ее атрофии.

Заключение

Таким образом, колонизация слизистой оболочки желудка штаммами *Helicobacter pylori* с генетической структурой, содержащей факторы патогенности *UreI, CagA, VacA, BabA, IceA*, при хроническом *Hp*-ассоциированном гастрите у детей является фактором усиления выраженности, активности и распространенности воспалительного процесса, появления признаков атрофии. Наибольшее влияние на указанные показатели оказывает присутствие в геноме микроорганизма *cagA*, а также сочетания нескольких факторов патогенности.

Литература

1. Александрова ВА, Козлова ИП. Спорные и нерешенные вопросы хеликобактерной инфекции у детей. Лечащий врач. 2011;2:13-6.

2. Сапожников ВГ, Воробьева АВ. Клинические проявления хронических болезней органов пищеварения у детей. Вестник новых медицинских технологий. 2015;22(1):23-6. DOI: 10.12737/9071

3. Нижевич АА, Валева ДС. Инфекция *Helicobacter pylori* в детском возрасте: современные аспекты диагностики и лечения. Болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у детей. М.: Медпрактика-М, 2017, с. 129-201.

4. Бельмер СВ, Гасилина ТВ. Хронический гастродуоденит у детей. Спорные вопросы. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2009;54(3):80-3.

5. Спивак ЕМ, Левит РМ, Аккуратова ИС, Надежин АС. Хронический гастродуоденит у детей: клинические варианты, особенности диагностики и лечения. Ярославль: Филигрань, 2016, 172 с.

6. Blaser MJ. The biology of *cagA* in the *Helicobacter pylori* – human interaction. Gastroenterology. 2005 May;128(5):1512-5.

7. Veres G, Pehlivanoglu E. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. Helicobacter. 2007;12(S1):38-44.

8. Барышникова НВ, Суворов АН, Ткаченко ЕИ, Успенский ЮП. Роль генетических особенностей *Helicobacter pylori* в патогенезе заболеваний органов пищеварения: от теории к практике. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2009;1:12-9.

9. Фадеенко ГД. Инфекция *Helicobacter pylori*: итоги 20-летнего изучения ее патогенности. Вестник Харьковского национального университета. Медицина. 2004;614:107-12.

10. Файзуллина РА, Абдуллина ЕВ. Факторы патогенности и вирулентности *Helicobacter pylori* и их роль в развитии хеликобактер-ассоциированной гастродуоденальной патологии. Практическая медицина. 2011;1(49):74-8.

11. Исаков ВА, Домарадский ИВ. Хеликобактериоз. М.: ИД Медпрактика, 2003, 412 с.

12. Ливзан МА. Факторы ответа хозяина на инфекцию *Helicobacter pylori*. Consilium Medicum. Гастроэнтерология. 2010;8(12):10-4.

13. Барышникова НВ. Актуальные проблемы диагностики хеликобактериоза. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2009;2:50-6.

14. Pride DT, Meinersmann RL, Blaser MJ. Allelic variation within *Helicobacter pylori* *babA* and *babB*. Infect Immun. 2001 Feb;69(2):1160-71. DOI: 10.1128/IAI.69.2.1160-1171.2001

15. Shiota S, Suzuki R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in *H. pylori*. J Dig Dis. 2013 Jul;14(7):341-9. DOI: 10.1111/1751-2980.12054.

16. Olfat F. O., Zheng Q., Oleastro M. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor *BabA* with duodenal ulcer disease in four European countries. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005 May 1;44(2):151-6. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.10.010

17. Yamaoka Y, Graham DY. Disease-specific *Helicobacter pylori* virulence factors: the role of *cagA, vacA, iceA, babA2* alone or in combination. *Helicobacter pylori*: basic mechanisms to clinical cure 2000. Kluwer Academic Publishers. 2000, p. 37-42.

18. Mendoza-Elizalde S, Cortés-Márquez AC, Giono-Cerezo S, Zuñiga G, Consuelo-Sánchez A, Valencia-Mayoral P, et al. Analysis of genotypic diversity of strains of *Helicobacter pylori* isolated from pediatric patients in Mexico. Infect Genet Evol. 2015 Jan;29:68-74. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.11.002

References

1. Aleksandrova VA, Kozlova IP. Spornye i nereshennye voprosy khelikobakternoi infektsii u detei. Lechaschi Vrach Journal. 2011;2:13-6. (In Russian).

2. Sapozhnikov VG, Vorobiyova AV. The Clinical Manifestations of Chronic Diseases of the Digestive System in Children. Journal of New Medical Technologies. 2015;22(1):23-6. DOI: 10.12737/9071 (In Russian).

3. Nizhevich AA, Valeeva DS. Infektsiya *Helicobacter pylori* v detskom vozraste: sovremennye aspekty diagnostiki i lecheniya. Bolezni zheludka i dvenadtsatiperstnoi kishki u detei [*Helicobacter pylori* infection in children: modern aspects of diagnosis and treatment]. Moscow: "Medpraktika-M" Publ., 2017, pp. 129-201. (In Russian).

4. Belmer SV, Gasilina TV. Chronic gastroduodenitis in children: Controversial points. Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics). 2009;54(3):80-3. (In Russian).
5. Spivak EM, Levit RM, Akkuratova IS, Nadezhin AS. Khronicheskii gastroduodenit u detei: klinicheskie varianty, osobennosti diagnostiki i lecheniya [Chronic gastroduodenitis in children: clinical variants, diagnostic features and treatment]. Yaroslavl: "Filigran" Publ., 2016, 172 p. (In Russian).
6. Blaser MJ. The biology of cag in the *Helicobacter pylori* – human interaction. Gastroenterology. 2005 May;128(5):1512-5.
7. Veres G, Pehlivanoglu E. Helicobacter pylori infeciontrics in pediatrics. *Helicobacter*. 2007;12(S1):38-44.
8. Baryshnikova NV, Suvorov AN, Tkachenko EI, Uspenskii YuP. Rol' geneticheskikh osobennostei *Helicobacter pylori* v patogeneze zabolevanii organov pishchevareniya: ot teorii k praktike. Eksperimental'naia i klinicheskaiia gastroenterologiiia (Experimental & Clinical Gastroenterology). 2009;1:12-9. (In Russian).
9. Fadeenko GD. *Helicobacter pylori* infection: the results of 20-years study of its pathogenicity. The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University, Series "Medicine". 2004;614:107-112. (In Russian).
10. Faizullina RA, Abdullina EV. Factors of pathogenicity and virulence of *Helicobacter pylori* in the development of *Helicobacter*-associated gastroduodenal pathology. Practical Medicine. 2011;1(49):74-8. (In Russian).
11. Isakov VA, Domaradskii IV. Khelikobakterioz [*Helicobacter*]. Moscow: "Medpraktika" Publ., 2003, 412 p. (In Russian).
12. Livzan MA. Faktory otveta khozyaina na infektsiyu *Helicobacter pylori*. Consilium Medicum. 2010;8(12):10-4. (In Russian).
13. Baryshnikova NV. Aktual'nye problemy diagnostiki khelikobakterioza. Eksperimental'naia i klinicheskaiia gastroenterologiiia (Experimental & Clinical Gastroenterology). 2009;2:50-6. (In Russian).
14. Pride DT, Meinersmann RL, Blaser MJ. Allelic variation within *Helicobacter pylori* babA and babB. Infect Immun. 2001 Feb;69(2):1160-71. DOI: 10.1128/IAI.69.2.1160-1171.2001
15. Shiota S, Suzuki R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in *H. pylori*. J Dig Dis. 2013 Jul;14(7):341-9. DOI: 10.1111/1751-2980.12054.
16. Olfat F. O., Zheng Q., Oleastro M. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005 May 1;44(2):151-6. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.10.010
17. Yamaoka Y, Graham DY. Disease-specific *Helicobacter pylori* virulence factors: the role of cagA, vacA, iceA, babA2 alone or in combination. *Helicobacter pylori*: basic mechanisms to clinical cure 2000. Kluwer Academic Publishers. 2000, p. 37-42.
18. Mendoza-Elizalde S, Cortés-Márquez AC, Giono-Cerezo S, Zuñiga G, Consuelo-Sánchez A, Valencia-Mayoral P, et al. Analysis of genotypic diversity of strains of *Helicobacter pylori* isolated from pediatric patients in Mexico. Infect Genet Evol. 2015 Jan;29:68-74. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.11.002

Информация об авторах:

Левит Рита Моисеевна, доктор медицинских наук, ассистент кафедры факультетской педиатрии с пропедевтикой детских болезней ФГБОУ ВО «Ярославский медицинский университет»
 Адрес: 150054, Ярославль, ул. Революционная, 5
 Телефон: (4852) 30-5641
 E-mail: rlevit@mail.ru

Кузьмина Галина Владимировна, заведующая лабораторией бактериологии и паразитологии ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской области»
 Адрес: 150054, Ярославль, ул. Чкалова, 4
 Телефон: (4852) 25-2234
 E-mail: mail@fguz.yar.ru

Деменчук Марина Юрьевна, врач-бактериолог лаборатории бактериологии и паразитологии ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской области»
 Адрес: 150054, Ярославль, ул. Чкалова, 4
 Телефон: (4852) 25-2234
 E-mail: mail@fguz.yar.ru

Information about authors:

Rita M. Levit, MD, PhD, DSc, assistant professor of the department of faculty pediatrics with the propaedeutics childhood diseases, Yaroslavl State Medical University
 Address: 5 Revolutsiionnaya str., Yaroslavl, 150054, Russian Federation
 Phone: (4852) 30-5641
 E-mail: rlevit@mail.ru

Galina V. Kuzmina, head of laboratory of bacteriology and parasitology, Center of Hygiene and Epidemiology in Yaroslavl region
 Address: 4 Chkalov str., Yaroslavl, 150054, Russian Federation
 Phone: (4852) 25-2234
 E-mail: mail@fguz.yar.ru

Marina Yu. Demenchuk, doctor-bacteriologist of the laboratory of bacteriology and parasitology, Center of Hygiene and Epidemiology in Yaroslavl region
 Address: 4 Chkalov str., Yaroslavl, 150054, Russian Federation
 Phone: (4852) 25-2234
 E-mail: mail@fguz.yar.ru

Фрагменты генов «островов» патогенности *Escherichia coli* у клинических штаммов условно-патогенных представителей *Enterobacteriaceae* и клинико-лабораторные особенности острых кишечных инфекций

Р.Т.Мурзабаева, А.Р.Мавзютов, Д.Н.Дубровская

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Российская Федерация

В работе проведена сравнительная оценка частоты встречаемости фрагментов генов «островов» патогенности (ФГОП), ассоциированных с патогенностью *E. coli*, в геномах клинических штаммов условно-патогенных представителей *Enterobacteriaceae* (УПЭ) и клинико-лабораторных особенностей связываемых с ними острых кишечных инфекций (ОКИ) у взрослых. Обследовано 123 пациента с ОКИ, ассоциированными с УПЭ. В результате молекулярно-генетического исследования у 49 из 123 клинических штаммов УПЭ (39,84%) выявлены ФГОП. Указанные генетические особенности установлены у 8 из 10 штаммов *E. coli* (80%), изолированных при легких формах ОКИ, при средне-тяжелых ОКИ – в 32 из 103 случаев (31,1%, у *K. pneumoniae*) и при тяжелых – в 9 из 10 случаев (90%, у *Proteus spp.*). Установлена прямая, средней силы, корреляционная связь ($r^* = 0,41$, $p < 0,001$) и сильное влияние всей совокупности частоты обнаружения ФГОП у клинических штаммов УПЭ на тяжесть течения ОКИ. Показаны положительные связи между частотой обнаружения фрагментов генов *hlyA*, *hlyB*, *hlyD* у клинических штаммов УПЭ и уровнем лихорадки, продолжительностью болей в животе и величиной скорости оседания эритроцитов (СОЭ) у больных ОКИ, что может указывать на их участие в развитии интоксикации и диареи.

Ключевые слова: «острова» патогенности, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *Proteus spp.*, острые кишечные инфекции, клинико-лабораторные показатели

Для цитирования: Мурзабаева Р.Т., Мавзютов А.Р., Дубровская Д.Н. Фрагменты генов «островов» патогенности *Escherichia coli* у клинических штаммов условно-патогенных представителей *Enterobacteriaceae* и клинико-лабораторные особенности острых кишечных инфекций. Бактериология. 2017; 2(4): 30–35. DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-30-35

Fragments of pathogenicity islands genes of *Escherichia coli* of in clinical strains of opportunistic *Enterobacteriaceae* and clinical and laboratory features of acute intestinal infections

R.T.Murzabaeva, A.R.Mavzyutov, D.N.Dubrovskaya

Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

The research compares the incidence of gene fragments of pathogenicity islands (PIGF) associated with pathogenic *E. coli* in genomes of clinical opportunistic enterobacterial strains (OE) as well as clinical and laboratory characteristics of relevant acute intestinal infections (All) in adults. 123 patients suffering from acute intestinal infections caused by OE have been examined. A molecular-genetic research has identified PIGF in 49 (39.84%) of 123 clinical strains of opportunistic enterobacteria. These genetic features have been found in 8 of 10 *E. coli* (80%), in 32 of 103 *K. pneumoniae* (31.1%), and in 9 of 10 *Proteus spp.* strains for mild, moderate severity and sever forms of acute intestinal infections. There is a direct medium-strength correlation ($r = 0.41$, $p < 0.001$) and also a strong effect of the total incidence of PIGF in the clinical strains on the severity of the infections. There have been found positive correlations between the frequency of *hlyA*, *hlyB*, *hlyD* gene fragments in the opportunistic enterobacteria and intensity of fever, duration of abdominal pain and ESR index in the patients, suggesting their involvement into developing intoxication and diarrhea.

Keywords: pathogenicity islands, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *Proteus spp.*, acute intestinal infections, clinical -and-laboratory indices

For citation: Murzabaeva R.T., Mavzyutov A.R., Dubrovskaya D.N. Fragments of pathogenicity islands genes of *Escherichia coli* of in clinical strains of opportunistic *Enterobacteriaceae* and clinical and laboratory features of acute intestinal infections. Bacteriology. 2017; 2(4): 30–35. (In Russian). DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-30-35

Для корреспонденции:

Мавзютов Айрат Радикович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»

Адрес: 450008, Уфа, ул. Ленина, 3
Телефон: (347) 276-1960
E-mail: ufalab@mail.ru

Статья поступила 24.10.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Airat R. Mavzyutov, MD, PhD, DSc, professor, chief of department of fundamental and applied microbiology, Bashkir State Medical University

Address: 3 Lenina Str., Ufa, 450008, Russian Federation
Phone: (347) 276-19-60
E-mail: ufalab@mail.ru

The article was received 24.10.2017, accepted for publication 22.12.2017

До настоящего времени повсеместно сохраняется актуальность диарейных заболеваний. На территории Российской Федерации (РФ) в структуре инфекционной патологии они занимают второе место после острых респираторных вирусных инфекций. По-прежнему высока летальность, связанная с диареями, у детей в возрасте до 5 лет [1]. В США ежегодно регистрируется до 179 млн случаев острых кишечных инфекций (ОКИ), при этом на долю населения старших возрастных групп приходится до 83% случаев с летальным исходом [2]. Несмотря на возрастание в последние годы количества расшифрованных случаев вирусных диарей (до 60%) [3], не снижается эпидемиологическое значение условно-патогенных представителей *Enterobacteriaceae* (УПЭ) [4–8]. В частности, в 2016 г. доля острых диарей, ассоциируемых с УПЭ, по РФ в целом составила 9,5%, в отдельных субъектах колебалась от 5 до 29,3%, однако отношение к ним остается неоднозначным. До настоящего времени не существует единого взгляда на патогенность УПЭ, что существенно затрудняет оценку этиологической значимости клинических штаммов, выделяемых от больных, и снижает эффективность противоэпидемических мероприятий [4, 9].

Вместе с тем не вызывает сомнения существование конкретных генетически обусловленных механизмов изменения патогенности энтеробактерий [10, 11]. Определенные перспективы в этом направлении обозначились в связи с установлением феномена группирования ряда структурных и регуляторных генов, детерминирующих патогенность микроорганизмов, в мобильные кластеры («островки» и «острова» патогенности), способные к горизонтальному и вертикальному перемещению и встраиванию в определенные сайты бактериальной ДНК («горячие точки»). Полагают, что данный механизм изменения патогенности бактерий играет важную роль в эволюции условно-патогенных видов и селекции патогенных вариантов [12]. Фрагменты, гомологичные известным генам кластеров патогенности *E. coli*, были обнаружены в составе геномной ДНК представителей УПЭ, выделенных при ОКИ у детей и при сальмонеллезах у взрослых [4, 13]. В этой связи определенный интерес могут представлять клинко-экспериментальные параллели между частотой встречаемости генетических маркеров патогенности клинических штаммов УПЭ и клинко-лабораторными данными пациентов, от которых они выделялись.

Цель исследования – сравнительная оценка частоты встречаемости фрагментов генов «островов» патогенности (ФГОП), ассоциированных с патогенностью *E. coli*, в геномах клинических штаммов УПЭ и клинко-лабораторных особенностей связываемых с ними ОКИ у взрослых.

Материалы и методы

Оценка клинко-лабораторных данных проводилась у 123 пациентов с ОКИ, вызванными УПЭ, пролеченных в клинической инфекционной больнице №4 г. Уфы. Коллекция клинических штаммов УПЭ была сформирована в ходе бактериологического исследования фекалий обследуемых с использованием питательных сред (Эндо, Левина) отечественного производства (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Идентификацию культур осуществляли по биохимическим при-

знакам с использованием сред Гисса и систем для ускоренной идентификации (СИБ, ПБДЭ) (НПО «Диагностические системы», г. Н. Новгород).

Критериями исключения пациентов из анализируемой выборки были факты культурального выявления в фекалиях патогенных бактерий (*Shigella spp.*, *Salmonella spp.*) при использовании дифференциально-диагностических питательных сред (Бактоагар Плоскирева, ЭМС-агар и др.) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), положительные результаты РНГА с сальмонеллезными и шигеллезными диагностикумами (ФГУП «НПО «Микроген»), случаи выделения из испражнений культуральным методом диареогенных *Escherichia spp.* (агар Эндо-ГРМ, ЭМС-агар), верифицированных в РА с диагностическими поливалентными ОК-сыворотками (ОАО «БИОМЕД», Москва). Вирусная этиология диарей у обследованных исключалась методом ПЦР с применением наборов реагентов «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus – FL» для выявления в фекалиях РНК ротавирусов группы А, норовирусов 2 генотипа и астровирусов (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия).

Тотальную бактериальную ДНК выделяли из суточной агаровой культуры, используя стандартные наборы «ДНК-сорб-АМ» («ИнтерЛабСервис», Москва). ПЦР проводилась в амплификаторе МС-16 «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Были использованы подобранные нами праймеры к ряду генов, обнаруженных в составе «островов» патогенности *E. coli*, контролирующих продукцию гемолизина – *hlyA* (F-gaaagatcagtcctcattaccagcaaca/R-agcggctattcccatcttctctat); *hlyB* (F-acgcatggtgctgctgcaaatctt/R-ggcacccaactcaacatcaatccgact); *hlyD* (F-tggggttctggtattgctttatctgt/R-actgctcgcagctatttctcctgctca); цитолетального расширяющего токсина – *cdtB* (F-cagggctcaaatgcaccgacagaaataaatg/R-taacaacccaataacagcgaagcc ctcaaca); адгезин-интимина – *eae* (F-cctggtagctgtgctgctttggctt cc/R-taaactatactcggattcctctggtgacgat); фактора персистенции – *ivy* (F-tgcaaaaggcgcaaacaccacaa/R-gtcacgscgcaacaacacc) и синтезированных на базе ООО «Биоскрин», Россия.

Качество и размеры амплифицированных фрагментов ДНК оценивали электрофоретически в 1% агарозном геле. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали при помощи фотодокументирующей системы Gel Camera System (UVP, Inc. США). Статистическая обработка результатов проводилась с применением современных программных пакетов Biostatistica и Statistica 7.0.

Результаты и обсуждение

Под наблюдением находились 123 пациента в возрасте от 18 до 50 лет с ОКИ, при которых были выявлены только УПЭ. Клинический диагноз выставлялся на основании анализа комплекса клинко-эпидемиологических, бактериологических и серологических данных.

Клинически все случаи ОКИ протекали в виде гастроэнтерита (83%) и гастрита (17%). В 83,7% случаев регистрировалось среднетяжелое, в 8,15% – легкое и в 8,15% – тяжелое течение заболевания.

В ходе культурального исследования было выделено 123 клинических штамма УПЭ, среди которых были идентифицированы *K. pneumoniae* (65,0% случаев), *E. aerogenes*

(22,7% случаев), *Proteus spp.* (*Proteus mirabilis* – 66,7% случаев), *Proteus vulgaris* (33,3% случаев).

При легкой форме заболевания в 8 случаях были выделены *E. aerogenes*, в двух – *K. pneumoniae*. При среднетяжелом течении ОКИ чаще обнаруживались *K. pneumoniae* (73,8%), реже – *E. aerogenes* (17,5%), в единичных случаях — *Proteus vulgaris* (8,7%). При тяжелых формах ОКИ были выявлены *Proteus mirabilis* (6 шт.), по 2 штамма (по 20%) *K. pneumoniae* и *E. aerogenes* и один штамм *Proteus vulgaris*.

В результате молекулярно-генетического тестирования культур у 39,8% изолятов УПЭ были обнаружены нуклеотидные последовательности, гомологичные фрагментам генов, детерминирующих способность бактерий синтезировать гемолизины (*hlyA*, *hlyB*, *hlyD*), цитолетальный расширяющий токсин (*cdtB*), адгезин-интимин (*eae*) и фактор персистенции (*ivy*). Наиболее часто в наших исследованиях определялись ФГОП *hlyA*, *hlyB* и *hlyD* (19,5%), частота их выявления составила для *hlyA* – 6,5%, *hlyB* – 7,3% и *hlyD* – 5,7%. Фрагменты, комплементарные ФГОП *ivy*, обнаружены у 12,3% изолятов, *cdtB* – у 4,1% и *eae* – у 4,1%.

При изучении частоты обнаружения ФГОП в зависимости от видовой принадлежности культур УПЭ установлено, что с наибольшей частотой (10 из 15 штаммов) искомые генетические детерминанты несли *Proteus spp.* (66,7%), 18 из 28 штаммов *E. aerogenes* (64,3%). Значительно реже ФГОП обнаруживались у *K. pneumoniae* (26,3%), что было статистически значимо реже, нежели у *Proteus spp.* ($p = 0,003$) и *E. aerogenes* ($p < 0,001$) (табл. 1).

Штаммы *E. aerogenes* и *K. pneumoniae*, изолированные от пациентов с легкой формой ОКИ, характеризовались наличием искомых генетических детерминант в 7 из 10 и в 1 из 2 случаев соответственно. Среди больных со среднетяжелым течением диареи у 31,1% из выделенных клинических штаммов УПЭ обнаруживались ФГОП. Изоляты *K. pneumoniae*

несли искомые генетические детерминанты в 17,5%, *E. aerogenes* и *Proteus spp.* – в 8,7% и 4,9% случаях соответственно. При тяжелом течении заболевания у выделенных штаммов УПЭ в целом ФГОП определялись с наибольшей частотой (90%).

В результате частотно-дисперсионного анализа характера взаимосвязей между частотой встречаемости ФГОП у клинических штаммов УПЭ и степенью тяжести ОКИ у пациентов показано, что в случаях, ассоциированных с *Proteus spp.*, ФГОП в бактериальных геномах обнаруживались в 66,7% случаев (табл. 2).

При этом была выявлена прямая корреляционная связь средней силы ($r^* = 0,37$, $p = 0,046$) и значимое влияние частоты обнаружения генетических детерминант вирулентности на тяжесть заболевания – 22% ($\eta^2 = 22\%$; $F = 17,4$; $p < 0,001$).

При ОКИ, ассоциированной с *K. pneumoniae*, у которых ФГОП были обнаружены в 26,3% случаев, сила влияния частоты выявления указанных генетических вариантов бактерий данного вида на степень тяжести болезни была низкой и составила 1% ($\eta^2 = 1,0\%$; $F = 0,7$; $p > 0,05$), чем, по-видимому, обусловлено преобладание среднетяжелых форм болезни. У пациентов с ОКИ, связываемыми с *E. aerogenes*, выявлена прямая, средней силы, значимая корреляционная связь ($r^* = 0,46$, $p < 0,001$) и значительное, средней силы влияние частоты обнаружения ФГОП, выявленных у 64,3% штаммов *E. aerogenes*, на тяжесть течения заболевания (21,0% ($\eta^2 = 21,0\%$; $F = 16,9$; $p < 0,001$)). Установлена прямая, средней силы, корреляционная связь ($r^* = 0,41$, $p < 0,001$) и сильное влияние всей совокупности частоты обнаружения ФГОП, выявленных у 49 изолятов УПЭ, с которыми связывали этиологию ОКИ у исследуемых пациентов, на тяжесть заболевания (17% ($\eta^2 = 17,0\%$; $F = 12,0$; $p < 0,001$)).

Для определения патогенетической роли генетических детерминант в развитии клинических проявлений ОКИ, ас-

Таблица 1. Частота встречаемости ФГОП в зависимости от вида возбудителя острых кишечных инфекций

Виды УПЭ	Частота встречаемости фрагментов генов «островов» патогенности, абс. ч. и %						Итого	η^2 (%)	F, p , r^*
	<i>cdtB</i>	<i>eae</i>	<i>ivy</i>	<i>hlyA</i>	<i>hlyB</i>	<i>hlyD</i>			
<i>K. pneumoniae</i> , n = 80	0	0	12	3	3	3	21 (26,3%)	8,9	4,24 $p = 0,117$ $r^* = 0,30$ $p = 0,006$
<i>E. aerogenes</i> , n = 28	5	5	3	2	2	1	18 (64,3%)	7,4	1,04 $p = 0,896$ $r^* = 0,27$ $p = 0,165$
<i>Proteus spp.</i> , n = 15	0	0	0	3	4	3	10 (66,7%)	5,5	1,15 $p = 0,674$ $r^* = 0,24$ $p = 0,389$
Всего, n = 123	5/4,1%	5/4,1%	15/12,3%	8/6,5%	9/7,3%	7/5,7%	49 (39,8%)	15,0	10,24 $p = 0,006$ $r^* = 0,37$ $p < 0,001$

Примечание: η^2 – сила влияния фактора; F – критерий Фишера; p – уровень значимости, r^* – коэффициент канонической корреляции.

Таблица 2. Сила влияния УПЭ на частоту выделения 6 видов ФГОП у возбудителей при острых кишечных инфекциях

Возбудитель	Степень тяжести			Итого ФГОП	η^2	F	p	r^*
	Легкая, n = 10	Среднетяжелая, n = 103	Тяжелая, n = 10					
<i>K. pneumoniae</i> , n = 80	1	18 (17,5%)	2	21	1,0	0,7	>0,05	0,10 ($p = 0,929$)
<i>E. aerogenes</i> , n = 28	7	9 (8,7%)	2	18	21,0	16,9	<0,001	0,46 ($p = 0,013$)
<i>Proteus spp.</i> , n = 15	0	5 (4,9%)	5	10	22,0	17,4	<0,001	0,37 ($p = 0,046$)
Всего, n = 123	8	32 (31,1%)	9	49	17,0	12,0	<0,001	0,41 ($p < 0,001$)

Примечание: η^2 – сила влияния фактора, F – критерий Фишера, p – уровень значимости, r^* – коэффициент канонической корреляции.

социированных с высевом УПЭ, исследуемые пациенты были разделены на 2 группы без учета степени тяжести заболевания и вида возбудителя. В первую группу включили пациентов, от которых изолированы УПЭ, несущие генетические детерминанты патогенности: *cdtB*, *eae*, *ivy*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyD*, а во вторую – больных, от которых были выделены штаммы бактерий, не содержащих искомым ФГОП. Сравнимые группы были сопоставимы по возрасту и локализации воспалительного процесса в желудочно-кишечном тракте. В клинических проявлениях заболевания в сравниваемых группах выявлены отличия (табл. 3).

В 1-й группе пациентов имели место более продолжительная лихорадка ($p < 0,01$) и ряд проявлений интоксикации, проявлялись симптомы гастроэнтерита, сохранявшиеся достаточно длительное время (продолжительность диареи, $p < 0,01$; болей в животе, $p < 0,01$; рвоты, $p < 0,01$).

При оценке показателей общего анализа крови пациентов в динамике болезни показан более выраженный лейкоцитоз у больных 1-й группы в остром периоде болезни, чем у пациентов группы сравнения ($p < 0,02$), что может свидетельствовать об интенсивности воспалительного процесса. Однако по другим параметрам крови статистически значимых различий не выявлено.

В группе больных с обнаружением УПЭ, включавших фрагменты генов, гомологичных некоторым генетическим детерминантам вирулентности, в отдельности выявлены статистически значимые корреляционные взаимосвязи (по критерию Спирмена и линейной регрессии) между частотой обнаружения *hlyD* и высокой лихорадкой ($r = 0,35$; $p < 0,05$), *hlyA* и величиной СОЭ ($r = 0,19$; $p = 0,035$), *hlyB* и продолжительностью болей в животе ($r = 0,20$; $p = 0,026$) (табл. 4).

Таким образом, есть определенные основания полагать, что у пациентов, от которых были изолированы УПЭ, несущие ФГОП, заболевание отличается более тяжелым течением с выраженными симптомами интоксикации и поражения желудочно-кишечного тракта, что согласуется с выявленными ранее изменениями цитокинового профиля при ОКИ, вызванных энтеробактериями [14].

Фенотипическая характеристика условно-патогенных бактерий достаточно давно и успешно используется для оценки их этиологической значимости и для эпидемиологической расшифровки вспышек [14–17]. Наряду с указанным, существует еще один важный аспект вирулентности микроорганизмов, обусловленный их детерминированностью особыми мобильными элементами, именуемыми «острова», или «островки» патогенности [18]. И высказывалось предположение о том, что горизонтальный перенос мобильных генов «островов» патогенности может вносить весомый вклад в пластичность генома УПЭ, определяющую изменение их патогенного потенциала [12, 19]. Полученные нами результаты по оценке частоты обнаружения генетических детерминант вирулентности у УПЭ, ассоциируемых с синтезом гемолизина, цитотоксинов, адгезинов и факторов персистенции, согласуются с данными литературы. На начальном этапе ОКИ эффективность связывания возбудителя с рецепторами эпителиоцитов (адгезия) с последующим размножением в зоне инфицирования определяют фимбриальные адгезины [20]. Фактор адгезии *eae* обнаруживается и у

E. aerogenes, *C. freundii* и *H. alvei* [15]. Устойчивость к факторам защиты организма и длительную персистенцию в кишечнике после его колонизации энтеробактериям обеспечивают гемолизины и вещества, инактивирующие лизоцим (фактор *ivy*) [16, 21, 22].

У представителей семейства *Enterobacteriaceae* обнаружены токсины, нарушающие цитоскелет эпителиальных клеток путем реорганизации нитей F-актина: цитолетальный расширяющий токсин (*cdtA*, *cdtB*), цитотоксины, вызывающие гибель клеток (шига- и шигаподобные токсины, гемолизины) [23–25]. Гемолизины формируют каналы (или поры) в мембране клеток с нарушением секреции–всасывания электролитов через плазматическую мембрану, участвуют во внутриклеточном размножении возбудителя, развитии воспалительного процесса и диареи, оказывают токсическое действие [4, 17]. У *E. aerogenes* обнаружен цитотоксический некротизирующий фактор 1 (*cnf1*), который ассоциируется с энтеритами и внекишечными инфекциями (септицемия и пиелонефрит). Показано, что совместный эффект хромосомного гена в сцепке с генами *hly* и фимбриальным геном *prs* оказывает патологическое действие [26, 27].

В последние годы появились новые данные, подтверждающие положение о переносах генов островов патогенности, определяющих пластичность генома УПЭ. В частности, возможность латерального переноса генов была показана для грамположительных бактерий [28], включая перенос генов между разными (*St. aureus*–*St. epidermidis*) и филогенетически достаточно удаленными видами (*St. aureus*–*L. monocytogenes*)

Таблица 3. Клиническая картина острых кишечных инфекций в группах больных в зависимости от присутствия ФГОП в выделенных культурах УПЭ

Показатели	Средняя продолжительность симптомов (в днях), $M \pm t$		p – уровень значимости
	1-я группа, $n = 49$	2-я группа, $n = 74$	
Пребывание в стационаре	10,5 ± 1,21	9,91 ± 1,04	>0,5
Продолжительность лихорадки (38°С и более)	1,96 ± 0,12	1,45 ± 0,10	<0,01
Длительность жидкого стула	3,69 ± 0,37	2,22 ± 0,21	<0,01
Длительность болевого синдрома	2,9 ± 0,22	1,92 ± 0,20	<0,01
Длительность рвоты	2,03 ± 0,28	1,12 ± 0,19	<0,01
Возраст средний	28,1 ± 0,28	27,9 ± 0,31	>0,5
Показатели общего анализа крови при поступлении в стационар			
СОЭ	11,8 ± 1,21	10,2 ± 1,1	>0,5
Лейкоциты	9,2 ± 0,56	7,43 ± 0,46	<0,02
Эритроциты	4,02 ± 0,58	4,06 ± 0,58	>0,5
Гемоглобин	138,6 ± 14,90	140,8 ± 15,71	>0,5
Тромбоциты	204,5 ± 21,16	201,8 ± 19,40	>0,5
Примечание: 1-я группа – больные с ОКИ с наличием ФГОП в геноме выделенных штаммов УПЭ; 2-я группа – пациенты с отсутствием генетических детерминант патогенности у клинических культур возбудителя.			

Таблица 4. Корреляционные взаимосвязи между признаками в группе больных с наличием генетических детерминант в геноме изолятов УПЭ

Признаки	Признаки	Критерий Спирмена, уровень значимости
<i>ivy</i>	<i>hlyB</i>	$r = -0,46$; $p < 0,05$
<i>hlyD</i>	Высокая лихорадка	$r = 0,35$; $p < 0,05$
<i>hlyA</i>	Величина СОЭ	$r = 0,19$; $p = 0,035$
<i>hlyB</i>	Продолжительность боли	$r = 0,20$; $p = 0,026$
<i>eae</i>	Уровень лихорадки	$r = 0,10$; $p = 0,271$

[29]. Получены доказательства возможности горизонтально-го переноса генов антибиотикорезистентности между бактериями, в том числе во внешней среде [30].

Таким образом, можно предположить, что полученные нами результаты о частоте встречаемости ФГОП (*hlyA*, *hlyB*, *hlyD*, *cdtB*, *eae*, *ivy*) у клинических штаммов УПЭ при ОКИ у взрослых и установленные корреляционные взаимосвязи между ними и степенью тяжести, отдельными клиническими симптомами заболевания и лабораторными показателями, наряду с известными факторами вирулентности энтеробактерий, могут использоваться для оценки этиологической значимости выделенных культур.

Выводы

1. При ОКИ, ассоциированных с УПЭ, от пациентов выделяются *K. pneumoniae* (65%), *E. aerogenes* (22,8%), *Proteus spp.* (12,2%), отличающиеся наличием ряда генетических детерминант, ассоциируемых с патогенностью *E. coli* (39,84%).

2. Частота обнаружения ФГОП, определяющих продукцию гемолизина (*hlyA*, *hlyB*, *hlyD*), цитолетального токсина (*cdtB*), интимина (*eae*) и фактора персистенции (*ivy*) коррелирует с тяжестью течения заболевания ($r^* = 0,41$, $p < 0,001$).

3. Выявленные корреляционные взаимосвязи между частотой обнаружения ФГОП у клинических штаммов УПЭ и тяжестью течения, отдельными симптомами заболевания и лабораторными показателями могут свидетельствовать об этиологической значимости выделенных культур.

Литература

- Walker CL, Black RE. Diarrhoea morbidity and mortality in older children, adolescents, and adults. *Epidemiol Infect.* 2010;138:1215-26. DOI: 10.1017/S0950268810000592
- DuPont HL. Acute infectious diarrhea in immunocompetent adults. *N Engl J Med.* 2014;370:1532-40. DOI: 10.1056/NEJMr1301069
- Резник ВИ, Никифорова АВ, Лебедева ЛА, Перескокова МА, Забарная АА, Голубева ЕМ. Роль вирусных возбудителей при острых кишечных заболеваниях. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2011;18:83-8.
- Мавзютов АР, Бондаренко ВМ, Жеребцова НЮ, Валишин ДА. Факторы патогенности оппортунистических энтеробактерий и их роль в развитии диареи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2007;1:89-96.
- Малов ВА, Горобченко АН. Острые инфекционные диарейные заболевания. *Лечащий врач.* 2005;2:6-8.
- Шайхиева ГМ, Ефимов ГЕ, Кайданек ТВ, Шагиева ЗА. Эпидемиологическая характеристика вспышек острых кишечных инфекций на территории республики Башкортостан в 2007–2011 гг. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.* 2014;1(95):94-101.
- Farthing M, Salam MA, Lindberg G, Dite P, Khalif I, Salazar-Lindo E, et al. Acute diarrhea in adults and children: a global perspective. *J Clin Gastroenterol.* 2013 Jan;47(1):12-20. DOI: 10.1097/MCG.0b013e31826df662
- Zhang Z, Lai S, Yu J, Geng Q, Yang W, Chen Y, et al. Etiology of acute diarrhea in the elderly in China: A six-year observational study. *PLoS One.* 2017 Mar 21;12(3):e0173881. DOI: 10.1371/journal.pone.0173881.
- Бондаренко ВМ. Генетические маркеры вирулентности условно патогенных бактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2011;3:94-9.
- Carraro N, Durand R, Rivard N, Anquetil C, Barrette C, Humbert M, Burrus V. Salmonella genomic island 1 (SGI1) reshapes the mating apparatus of IncC conjugative plasmids to promote self-propagation. *PLoS Genet.* 2017 Mar 29;13(3):e1006705. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006705
- Ruiz-Perez F, Nataro JP. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Mar;71(5):745-70. DOI: 10.1007/s00018-013-1355-8.
- Мавзютов АР, Фиалкина СВ, Бондаренко ВМ. «Острова» патогенности условно-патогенных энтеробактерий. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2002;6:5-9.
- Мавзютов АР, Мурзабаева РТ, Назмутдинова РГ, Мирсяяпова ИА. Генетические маркеры патогенности *S. enteritidis*, антибиотикорезистентность культур и клинические особенности заболевания. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2012;3:40-2.
- Жеребцова НЮ, Валишин ДА, Мавзютов АР. Провоспалительные цитокины при острых кишечных инфекциях, вызванных энтеробактериями у детей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2007;3:48-52.
- Каротам ПА, Мазанкова ЛН, Боровик ТЭ, Баканов МИ. Значение белков острой фазы воспаления в патогенезе острых кишечных инфекций. *Детские инфекции.* 2005;4:24-8.
- Cavalieri SJ, Bochach GA, Snyder IS. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev.* 1984;48:326-43.
- Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61:137-69.
- Hacker J, Kaper J. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Ann Rev Microbiol.* 2000;54:641-79.
- Struve C, Roe CC, Stegger M, Stahlhut SG, Hansen DS, Engelthaler DM, et al. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *MBio.* 2015 Jul 21;6(4):e00630. DOI: 10.1128/mBio.00630-15
- Fleckenstein JM, Kopecko DJ. Breaching the mucosal barrier by stealth: an emerging pathogenic mechanism for enteroadherent bacterial pathogens. *J Clin Invest.* 2001;107(1):27-30.
- Monchois V, Abergel C, Sturgis J, Jeudy S, Claverie JM. *Escherichia coli* ykfE ORFan gene encodes a potent inhibitor of C-type lysozyme. *J Biol Chem.* 2001 May 25;276(21):18437-41. DOI: 10.1074/jbc.M010297200
- Simmons CP, Clare S, Dougan G. Understanding mucosal responsiveness: lessons from enteric bacterial pathogens. *Semin Immunol.* 2001;13(3):201-9. DOI: 10.1006/smim.2001.0313
- Белая ОФ, Гулазян ИМ, Юдина ЮВ, Пак СГ. Значение выявления маркеров токсинов возбудителей у больных ОКИ для диагностики и прогноза течения заболевания. *Инфекционные болезни: Современные проблемы диагностики и лечения: материалы Всероссийской конференции.* СПб., 2008.
- Bondarenko VM. Bacterial pathogenicity islands. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2001;4:67-74.
- Hinenoya A, Nagita A, Asakura M, Tsukamoto T, Ramamurthy T, Nair GB, et al. Cytotoxic Distending Toxin (Cdt)-Producing *Escherichia coli* Isolated from a Child with Bloody Diarrhea in Japan. *Microbiol Immunol.* 2007;51(4):435-8.
- Fournout S, Dozois CM, Odin M, Desautels C, Pères S, Héroult F, et al. Lack of a role of cytotoxic necrotizing factor 1 toxin from *Escherichia coli* in bacterial pathogenicity and host cytokine response in infected germ-free piglets. *Infect Immun.* 2000 Feb;68(2):839-47.
- Ramboarina S, Fernandes PJ, Daniell S, Islam S, Simpson P, Frankel G, et al. Structure of the bundle-forming pili from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2005 Dec 2;280(48):40252-60. DOI: 10.1074/jbc.M508099200
- Gyles C, Boerlin P. Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Vet Pathol.* 2014 Mar;51(2):328-40. DOI: 10.1177/0300985813511131
- Winste V., Liang C., Sanchez-Carballo P, Steglich M, Munar M, Bröker BM, et al. Wall teichoic acid structure governs horizontal gene transfer between major bacterial pathogens. *Nat Commun.* 2013;4:2345. DOI: 10.1038/ncomms3345

30. Wang Q, Mao D, Mu Q, Luo Y. Enhanced Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Freshwater Microcosms Induced by an Ionic Liquid. *PLoS One*. 2015 May 7;10(5):e0126784. DOI: 10.1371/journal.pone.0126784

References

1. Walker CL, Black RE. Diarrhoea morbidity and mortality in older children, adolescents, and adults. *Epidemiol Infect*. 2010;138:1215-26. DOI: 10.1017/S0950268810000592
2. DuPont HL. Acute infectious diarrhea in immunocompetent adults. *N Engl J Med*. 2014;370:1532-40. DOI: 10.1056/NEJMra1301069
3. Reznik VI, Nikiforova AV, Lebedeva LA, Pereskokova MA, Zabarnaya AA, Golubeva EM. The role of viral agents during the onsets of intestinal diseases. *Dal'nevostochnyi zhurnal infektsionnoi patologii*. 2011;18:83-8. (In Russian).
4. Mavzutov AR, Bondarenko VM, Zherebtsova NYu, Valishin DA. Pathogenicity factors of opportunistic enterobacteria and its role in development of diarrhea. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2007;1:89-96. (In Russian).
5. Malov VA, Gorobchenko AN. Ostrye infektsionnye diareynye zabolevaniya. *Lechaschi Vrach Journal*. 2005;2:6-8. (In Russian).
6. Shaikhiyeva GM, Yefimov GE, Kaidanek TV, Shagiyeva ZA. Epidemiological characteristics of outbreaks of acute intestinal infections in Bashkortostan in 2007–2011. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center SBRAMS*. 2014;1(95):94-101. (In Russian).
7. Farthing M, Salam MA, Lindberg G, Dite P, Khalif I, Salazar-Lindo E, et al. Acute diarrhea in adults and children: a global perspective. *J Clin Gastroenterol*. 2013 Jan;47(1):12-20. DOI: 10.1097/MCG.0b013e31826df662
8. Zhang Z, Lai S, Yu J, Geng Q, Yang W, Chen Y, et al. Etiology of acute diarrhea in the elderly in China: A six-year observational study. *PLoS One*. 2017 Mar 21;12(3):e0173881. DOI: 10.1371/journal.pone.0173881.
9. Bondarenko VM. Genetic virulence markers of opportunistic bacteria. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2011;3:94-9. (In Russian).
10. Carraro N, Durand R, Rivard N, Anquetil C, Barrette C, Humbert M, Burrus V. Salmonella genomic island 1 (SGI1) reshapes the mating apparatus of IncC conjugative plasmids to promote self-propagation. *PLoS Genet*. 2017 Mar 29;13(3):e1006705. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006705
11. Ruiz-Perez F, Nataro JP. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Mar;71(5):745-70. DOI: 10.1007/s00018-013-1355-8.
12. Mavzyutov AR, Fialkina SV, Bondarenko VM. Pathogenicity islands in opportunistic enterobacteria. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2002;6:5-9. (In Russian).
13. Mavzyutov AR, Murzabayeva RT, Nazmutdinova RG, Mirsayapova IA. The genetic markers of pathogenicity of *S. enteritidis*, antibiotic resistance of cultures and clinical characteristics of disease. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2012;3:40-2. (In Russian).
14. Zerebtsova NYu, Valishin DA, Mavzutov AR. Proinflammatory cytokines in children with acute enteric infections caused by enterobacteria. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2007;3:48-52. (In Russian).
15. Karotam PA, Mazankova LN, Borovik TE, Bakanov MI. Znachenie belkov ostroi fazy vospaleniya v patogeneze ostrykh kishhechnykh infektsii. *Children Infections*. 2005;4:24-8. (In Russian).
16. Cavalieri SJ, Bochach GA, Snyder IS. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev*. 1984;48:326-43.
17. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997;61:137-69.
18. Hacker J, Kaper J. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Ann Rev Microbiol*. 2000;54:641-79.

19. Struve C, Roe CC, Stegger M, Stahlhut SG, Hansen DS, Engelthaler DM, et al. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *MBio*. 2015 Jul 21; 6(4):e00630. DOI: 10.1128/mBio.00630-15
20. Fleckenstein JM, Kopecko DJ. Breaching the mucosal barrier by stealth: an emerging pathogenic mechanism for enteroadherent bacterial pathogens. *J Clin Invest*. 2001;107(1):27-30.
21. Monchois V, Abergel C, Sturgis J, Jeudy S, Claverie JM. *Escherichia coli* ykfE ORFan gene encodes a potent inhibitor of C-type lysozyme. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):18437-41. DOI: 10.1074/jbc.M010297200
22. Simmons CP, Clare S, Dougan G. Understanding mucosal responsiveness: lessons from enteric bacterial pathogens. *Semin Immunol*. 2001;13(3):201-9. DOI: 10.1006/smim.2001.0313
23. The importance of identifying markers of toxins of pathogens in patients with OKI for the diagnosis and prognosis of the disease. *Infectious diseases: Modern problems of diagnostics and treatment: proceedings of all-Russian conference*. St.Petersburg, 2008. (In Russian).
24. Bondarenko VM. Bacterial pathogenicity islands. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2001;4:67-74. (In Russian).
25. Hinenoya A, Nagita A, Asakura M, Tsukamoto T, Ramamurthy T, Nair GB, et al. Cytotoxic Distending Toxin (Cdt)-Producing *Escherichia coli* Isolated from a Child with Bloody Diarrhea in Japan.. *Microbiol Immunol*. 2007;51(4):435-8.
26. Fournout S, Dozois CM, Odin M, Desautels C, Pères S, Hérault F, et al. Lack of a role of cytotoxic necrotizing factor 1 toxin from *Escherichia coli* in bacterial pathogenicity and host cytokine response in infected germ-free piglets. *Infect Immun*. 2000 Feb;68(2):839-47.
27. Ramboarina S, Fernandes PJ, Daniell S, Islam S, Simpson P, Frankel G, et al. Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2005 Dec 2;280(48):40252-60. DOI: 10.1074/jbc.M508099200
28. Gyles C, Boerlin P. Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Vet Pathol*. 2014 Mar;51(2):328-40. DOI: 10.1177/0300985813511131
29. Winste V., Liang C., Sanchez-Carballo P, Steglich M, Munar M, Bröker BM, et al. Wall teichoic acid structure governs horizontal gene transfer between major bacterial pathogens. *Nat Commun*. 2013;4:2345. DOI: 10.1038/ncomms3345
30. Wang Q, Mao D, Mu Q, Luo Y. Enhanced Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Freshwater Microcosms Induced by an Ionic Liquid. *PLoS One*. 2015 May 7;10(5):e0126784. DOI: 10.1371/journal.pone.0126784

Информация о авторах:

Мурзабаева Расима Тимерьяровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
 Адрес: 450105, Уфа, ул. Запотоцкого, 37
 Телефон: (347) 250-18-83
 E-mail: rmurzabaeva@yandex.ru

Дубровская Дина Наилевна, заочный аспирант кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
 Адрес: 450105, Уфа, ул. Запотоцкого, 37
 Телефон: (347) 250-1870
 E-mail: dina_8383@mail.ru

Information about authors:

Rasima T. Murzabaeva, MD, PhD, DSc, professor, department of infectious diseases, Bashkir State Medical University
 Address: 37 Zapototskogo str., Ufa, 450105, Russian Federation
 Phone: (347) 250-1883
 E-mail: rmurzabaeva@yandex.ru

Dina N. Dubrovskaya, extramural post-graduate student, department of infectious diseases, Bashkir State Medical University
 Address: 37 Zapototskogo str., Ufa, 450105, Russian Federation
 Phone: (347) 250-1870
 E-mail: dina_8383@mail.ru

Использование рекомбинантного слитного белка тимозин альфа-фактор некроза опухолей-тимозин альфа человека для получения гибридом к тимозину альфа

С.С.Ветчинин, Е.В.Галкина

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

При использовании для иммунизации рекомбинантного слитного белка тимозин альфа-фактор некроза опухолей альфа-тимозин альфа были получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к рекомбинантному тимозину альфа человека. Моноклональные антитела были специфичны к N- и C-концам тимозина альфа и антигенной детерминанте, общей для тимозина альфа и фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α). Результаты гибридизации свидетельствовали о высокой эффективности использования слитных белков при получении моноклональных антител к низкомолекулярным пептидам.

Ключевые слова: тимозин альфа 1, фактор некроза опухолей альфа, слитный белок, гибридомы, моноклональные антитела

Для цитирования: Ветчинин С.С., Галкина Е.В. Использование рекомбинантного слитного белка тимозин альфа-фактор некроза опухолей-тимозин альфа человека для получения гибридом к тимозину альфа. Бактериология. 2017; 2(4): 36–39. DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-36-39

Use of recombinant fuse protein thymosine alpha-tumor necrosis factor alfa-human alpha thymosin to obtain hybridoma cells to thymosine alpha

S.S.Vetchinin, E.V.Galkina

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

Hybridoma cells, producing monoclonal antibodies to human recombinant alpha thymosin, have been obtained during using of recombinant fuse protein thymosin alpha-tumor necrosis factor alfa-thymosin alfa. Monoclonal antibodies were specific to the N- and C-ends of thymosin alpha and antigenic determinate common for alpha thymosin and tumor necrosis factor alpha. Results of fusing revealed high efficiency of using fuse proteins for obtaining monoclonal antibodies to low molecular peptides.

Keywords: thymosin alpha 1, tumor necrosis factor alpha, fuse protein, hybridomes, monoclonal antibodies

For citation: Vetchinin S.S., Galkina E.V. Use of recombinant fuse protein thymosine alpha-tumor necrosis factor alfa-human alpha thymosin to obtain hybridoma cells to thymosine alpha. Bacteriology. 2017; 2(4): 36–39. (In Russian). DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-36-39

Тимозин альфа 1 оказывает потенцирующее влияние на противоинфекционный и противоопухолевый иммунитет. В настоящее время разработаны и приняты для применения в клинической практике такие препараты с использованием тимозина альфа, как задаксин (препарат на основе рекомбинантного тимозина альфа) и рефнот (препарат на основе рекомбинантного слитного белка фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α) и тимозина альфа). Задаксин зарегистрирован в 35 странах мира и используется в основном

при лечении хронических вирусных гепатитов В и С [1–3]. Отмечены положительные результаты применения препарата при лечении пациентов с сепсисом, перитонитом и острой цитомегаловирусной инфекцией [4, 5], а также онкологических больных – применение в качестве противоракового иммуномодулирующего средства [6–11].

Получение панели моноклональных антител представляется актуальным с точки зрения разработки тест-систем для определения тимозина альфа 1 в сыворотке крови, что по-

Для корреспонденции:

Ветчинин Сергей Сергеевич, кандидат биологических наук, заведующий сектором Лайм-боррелиоза отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142283, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск, ГНЦ ПМБ
Телефон: 8 (4967) 36-0065
E-mail: vetchinin@obolensk.org

Статья поступила 25.11.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Sergey S. Vetchinin, PhD (Biol.), head of the Lyme-borreliosis sector, 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) 36-0065
E-mail: vetchinin@obolensk.org

The article was received 25.11.2017, accepted for publication 22.12.2017

зволяет получать дополнительную информацию об иммунном статусе пациентов при составлении оптимальных схем терапии, в частности у больных с хроническими вирусными гепатитами.

Конструирование гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МКАт), представляет собой вероятностный, зависящий от многих объективных и субъективных факторов процесс. В частности, вероятность получения более широкого спектра гибридом существенно возрастает от величины гуморального ответа при иммунизации антигеном. Чем выше титр антител в сыворотке мышей, тем больше специфических В-клеточных клонов образуется в селезенке. Для того чтобы обеспечить высокий гуморальный ответ при использовании низкомолекулярных пептидов для иммунизации животных, требуется их конъюгация с высокомолекулярными носителями.

Известно, что тимозин альфа 1 – это пептидный гормон тимуса, состоящий из 28 аминокислотных остатков, имеющий молекулярную массу 3108 Да [12], что явно недостаточно для получения высокого гуморального ответа даже при применении многократной и продолжительной схемы иммунизации. Для преодоления этих трудностей при иммунизации животных использовали рекомбинантный слитный белок, состоящий из трех пептидов: тимозин альфа 1-фактор некроза опухолей альфа-тимозин альфа 1 (Т-Ф-Т). При тестировании МКАт в иммуноферментном анализе (ИФА) твердую фазу сенсibilизировали рекомбинантными Т-Ф-Т, тимозином альфа 1, протимозином альфа и ФНО- α [13].

Материалы и методы

Иммунизация мышей. Мышей линии BALB/c иммунизировали подкожно 100 мкг Т-Ф-Т с полным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1. Через 28 дней подкожно вводили по 100 мкг Т-Ф-Т с неполным адъювантом Фрейнда (Sigma, США). Затем через 28 дней следовали три внутривенные инъекции по 20 мкг с десятидневными промежутками. Для гибридизации использовали спленоциты мышей с титрами сыворотки в ИФА не менее 1:10 000.

Гибридизация. Слияние миеломных клеток линии P3-X63-Ag8.653 со спленоцитами иммунных мышей проводили с использованием 50% (вес/объем) полиэтиленгликоля 4000 (Merck, Германия) и 5% (объем/объем) ДМСО (Sigma, США), pH 8,0 [14].

Селекцию гибридных клеток проводили на среде RPMI 1640, содержащей 20% (объем/объем) эмбриональной сыворотки теленка, 1 mM L-глутамин, 1 mM гипоксантина, 0,1 mM тимидина и 0,3 мкМ аминокперина (Sigma, США) в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для скрининга гибридных клеток, продуцирующих МКАт, использовали твердофазный ИФА на 96 луночных планшетах (Costar, США). Продукенты МКАт клонировали методом предельных разведений.

Криоконсервация гибридом. Гибридомы культивировали на среде RPMI 1640 (Sigma, США), содержащей 10% (объем/объем) эмбриональной сыворотки теленка (Gibco, США), 1 mM L-глутамин (Sigma, США) до концентрации 10⁶ клеток/мл в среде замораживания, содержащей 90% феталь-

ной сыворотки теленка и 10% диметилсульфоксида (Sigma, США) и помещали в хранилище с жидким азотом.

Имуноферментный анализ. В лунки планшета для ИФА вносили по 100 мкл рекомбинантных Т-Ф-Т, тимозина альфа 1, протимозина или ФНО- α в 0,01 M карбонатном буфере, pH 9,6 (ПанЭко, Россия) с концентрацией 5 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение ночи. Планшеты промывали фосфатно-солевым буферным раствором (ПанЭко, Россия) с 0,5% Твин 20 (ФБР-Т) 3 раза. Для блокирования неспецифических мест связывания в лунки добавляли по 100 мкл 1% раствора бычьего сывороточного альбумина в ФБР-Т и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Лунки промывали 3 раза ФБР-Т, добавляли по 100 мкл различных разведений сывороток иммунных мышей в ФБР-Т или культуральной жидкости гибридом и инкубировали в течение 45 мин при 37°C. Лунки промывали пятикратно ФБР-Т, добавляли по 100 мкл антимышиных кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, США) в рабочем разведении и инкубировали 45 мин при 37°C. Пятикратно отмывали планшеты и вносили в лунки по 100 мкл раствора субстрата (0,1% раствор ортофенилендиамина (Sigma, США) в 0,05 M цитрат-фосфатном буфере, 1 мкл/мл 33% H₂O₂). Через 10 мин инкубации реакцию останавливали добавлением 50 мкл 4 N раствора H₂SO₄. Учет результатов производили на планшетном фотометре «Униплан» (Россия) при длине волны 492 нм [15].

Результаты и обсуждение

В результате гибридизации получена 21 гибридома, продуцирующая МКАт к Т-Ф-Т. При проверке МКАт в твердофазном ИФА с рекомбинантными ФНО- α и тимозином альфа обнаружено, что МКАт 8 гибридом взаимодействовали только с Т-Ф-Т, 7 гибридом – с тимозином альфа, протимозином альфа и ФНО- α , 3 гибридомы – с тимозином альфа

Таблица. Взаимодействие МКАт с рекомбинантными белками

МКАт	ТФТ	ТФТ, Т, проТ, ФНО	ТФТ, Т	ТФТ, Т, проТ	ФНО
D6-1	D6-1				
D9-1				D9-1	
E6-1		E6-1			
E9-1		E9-1			
F7-1				F7-1	
C4-3	C4-3				
C8-3				C8-3	
D3-3	D3-3				
D7-3		D7-3			
F10-3		F10-3			
C7-4	C7-4				
E8-4		E8-4			
F5-4	F5-4				
F8-4			F8-4		
D5-5			D5-5		
D9-5	D9-5				
E4-5		E4-5			
E8-5	E8-5				
E9-5			E9-5		
F6-5	F6-5				
C6-1		C6-1			

ИФА – иммуноферментный анализ; МКАт – моноклональные антитела; Т-Ф-Т – рекомбинантный слитный белок тимозина альфа и фактора некроза альфа; ФНО – фактор некроза опухолей альфа; Т – тимозин альфа; проТ – протимозин альфа.

и 3 гибридомы – с тимозином альфа и протимозином альфа (таблица).

Взаимодействие МКАт только с Т-Ф-Т свидетельствует о наличии у слитного белка структурной детерминанты, отсутствующей у ФНО и тимозина альфа 1. Отсутствие гибридом, МКАт которых связывались бы только с ФНО, обусловлено тем, что N- и C-концевые участки ФНО скрыты в слитном белке.

Так как тимозин альфа 1 является продуктом протеолитического расщепления протимозина альфа по дипептиду Asp–vGly в позиции 29–30 с N-конца [16], можно предположить, что МКАт гибридом D9-1, F7-1 и С8-3 связываются с N-концевым фрагментом тимозина альфа 1 (отсутствие связывания с протимозином альфа), а МКАт гибридом Е6-1, Е9-1, D7-3, F10-3, Е8-4, Е4-5, С6-1 связываются с его С-концевым фрагментом (имеется связывание с протимозином альфа). Взаимодействие МКАт ряда гибридом как с тимозином альфа 1, так и с ФНО альфа, возможно, связано с наличием в структуре пептидов гомологичных участков.

Таким образом, применение подобных конструкций для низкомолекулярных пептидов увеличивает вероятность получения более широкого репертуара гибридом-продуцентов МКАт.

Полученные МКАт к тимозину альфа 1 в перспективе могут использоваться в тест-системах не только при контроле качества лечебных препаратов, но и при получении дополнительной информации по уровню тимозина в сыворотках людей в норме и при патологии, в частности при лечении различных вирусных и бактериальных заболеваний.

Выражение признательности

Авторы благодарны В.А.Шмелеву за предоставление антигенов для иммунизации и тестирования моноклональных антител.

Литература

1. Loggi E, Gramenzi A, Margotti M, Cursaro C, Galli S, Vitale G, et al. In vitro effect of thymosin-alpha1 and interferon-alpha on Th1 and Th2 cytokine synthesis in patients with eAg-negative chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2008 Jun;15(6):442-8. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2007.00960.x
2. Piratvisuth T. Reviews for APASL guidelines: immunomodulator therapy of chronic hepatitis B. *Hepato Int.* 2008 Jun;2(2):140-6. DOI: 10.1007/s12072-008-9046-5
3. Yang YF, Zhao W, Zhong YD, Yang YJ, Shen L, Zhang N, Huang P. Comparison of the efficacy of thymosin alpha-1 and interferon alpha in the treatment of chronic hepatitis B: a meta-analysis. *Antiviral Res.* 2008 Feb;77(2):136-41. DOI: 10.1016/j.antiviral.2007.10.014
4. Garaci E, Favalli C, Pica F, Sinibaldi Vallebona P, Palamara AT, Matteucci C, et al. Thymosin alpha 1: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Sep;1112:225-34. DOI: 10.1196/annals.1415.044
5. Goldstein AL, Goldstein AL. From lab to bedside: emerging clinical applications of thymosin alpha1. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 May;9(5):593-608. DOI: 10.1517/14712590902911412
6. Gish R, Baron A. Hepatocellular carcinoma (HCC): current and evolving therapies. *Drugs. Biologics.* 2008 Sep;2(3):453-62.
7. Славина ЕГ, Черткова АИ, Заботина ТН, Борунова АА, Нуртдинова ВА, Абрамов МЕ, Кадагидзе ЗГ. Рефнот – новый отечественный иммуномодулятор для лечения меланомы. *Российский аллергологический журнал.* 2012;5(1):248-9.

8. Шмелёв ВА. Интерферон-гамма, фактор некроза опухолей, тимозин-альфа1 – противоионфекционные и противоопухолевые цитокины и препараты. М.: МедПрактика-М, 2008, 536 с.
9. Шмелёв ВА. Рефнот. Рекомбинантный фактор некроза опухолей-тимозин- α 1, препарат с низкой системной токсичностью для лечения онкологических заболеваний. М., Рефнот-Фарм, 2010, 92 с.
10. Владимировича ЛЮ, Захарова НП, Подзорова НА. Клинико-рентгенологические результаты лечения больных местно-распространенным раком молочной железы с перитуморальным применением рекомбинантного фактора некроза опухоли – тимозин- α 1. *Фундаментальные исследования.* 2015;1-8:1548-53.
11. Нефедова НА, Харлова ОА, Данилова НВ, Мальков ПГ, Гайфуллин НМ. Маркеры ангиогенеза при опухолевом росте. *Архив патологии.* 2016;78(2):55-63. DOI: 10.17116/patol201678255-62
12. Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, McClure J, Thurman GB, Rossio J, et al. Thymosin alpha 1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Feb;74(2):725-9.
13. Шмелёв ВА, Бунина ЗФ, Кудрявцева ТЮ, Зинченко ЕВ, Болдарева ЕФ, Коробко ВГ. Получение группы гибридных белков, состоящих из фактора некроза опухолей α и тимозина α 1. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 1995;1:9-14.
14. Nowinski RC, Lostrom ME, Tam MR, Stone MR, Burnette W.N. The isolation of hybrid lines producing monoclonal antibodies against the p 15 (E) protein of ceotropic murine Leukemia viruses. *Virology.* 1979;93:111-26.
15. Михайлов АТ, Смирский ВН. Методы иммунологического анализа в биологии развития. М.: Наука, 1991, с. 176.
16. Sarandeses CS, Covelo G, Diaz-Jullien C, Freire M. Prothymosin alpha is processed to thymosin alpha 1 and thymosin alpha 11 by a lysosomal asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem.* 2003 Apr 11;278(15):13286-93. DOI: 10.1074/jbc.M213005200

References

1. Loggi E, Gramenzi A, Margotti M, Cursaro C, Galli S, Vitale G, et al. In vitro effect of thymosin-alpha1 and interferon-alpha on Th1 and Th2 cytokine synthesis in patients with eAg-negative chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2008 Jun;15(6):442-8. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2007.00960.x
2. Piratvisuth T. Reviews for APASL guidelines: immunomodulator therapy of chronic hepatitis B. *Hepato Int.* 2008 Jun;2(2):140-6. DOI: 10.1007/s12072-008-9046-5
3. Yang YF, Zhao W, Zhong YD, Yang YJ, Shen L, Zhang N, Huang P. Comparison of the efficacy of thymosin alpha-1 and interferon alpha in the treatment of chronic hepatitis B: a meta-analysis. *Antiviral Res.* 2008 Feb;77(2):136-41. DOI: 10.1016/j.antiviral.2007.10.014
4. Garaci E, Favalli C, Pica F, Sinibaldi Vallebona P, Palamara AT, Matteucci C, et al. Thymosin alpha 1: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Sep;1112:225-34. DOI: 10.1196/annals.1415.044
5. Goldstein AL, Goldstein AL. From lab to bedside: emerging clinical applications of thymosin alpha1. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 May;9(5):593-608. DOI: 10.1517/14712590902911412
6. Gish R, Baron A. Hepatocellular carcinoma (HCC): current and evolving therapies. *Drugs. Biologics.* 2008 Sep;2(3):453-62.
7. Slavina EG, Chertkova AI, Zabolina TN, Borunova AA, Nurtdinova VA, Abramov ME, Kadagidze ZG. Refnot – novyi otechestvennyi immunomodulyator dlya lecheniya melanomy. *Russian Allergology Journal.* 2012;5(1):248-9. (In Russian).
8. Shmelev VA. Interferon-gamma, faktor nekroza opukholei, timozin-al'fa1 – protivoinfektsionnye i protivopukholevye tsitokiny i preparaty. Moscow: "MedPraktika-M" Publ., 2008, 536 p. (In Russian).
9. Shmelev VA. Refnot. Rekombinantnyi faktor nekroza opukholei-timozin- α 1, preparat s nizkoi sistemnoi toksichnost'yu dlya lecheniya onkologicheskikh zabolevanii. Moscow, Refnot-Farm, 2010, 92 p. (In Russian).

10. Vladimirova LY, Zakharova NP, Podzorova NA. Clinical and radiological results of treatment of locally advanced breast cancer patients with peritumoral application of recombinant tumor necrosis factor-alpha-thymosin-alpha1. *Fundamental Research*. 2015;1-8:1548-53. (In Russian).
11. Nefedova NA, Kharlova OA, Danilova NV, Malkov PG, Gaifullin NM. Markers of angiogenesis in tumor growth. *Arkhiv Patologii (Archive of Pathology)*. 2016;78(2):55-63. DOI: 10.17116/patol201678255-62 (In Russian).
12. Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, McClure J, Thurman GB, Rossio J, et al. Thymosin alpha 1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Feb;74(2):725-9.
13. Shmelev VA, Bunina ZF, Kudryavtseva TYu, Zinchenko EV, Boldareva EF, Korobko VG. Poluchenie gruppy gibridnykh belkov, sostoyashchikh iz faktora nekroza opukholei α i тимозина α 1. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 1995;1:9-14. (In Russian).
14. Nowinski RC, Lostrum ME, Tam MR, Stone MR, Burnette W.N. The isolation of hybrid lines producing monoclonal antibodies against the p 15 (E) protein of ceotropic murine Leukemia viruses. *Virology*. 1979;93:111-26.
15. Mikhailov AT, Simirskii VN. *Metody immunologicheskogo analiza v biologii razvitiya*. Moscow: "Nauka" Publ., 1991, p. 176. (In Russian).
16. Sarandeses CS, Covelo G, Diaz-Jullien C, Freire M. Prothymosin alpha is processed to thymosin alpha 1 and thymosin alpha 11 by a lysosomal asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem*. 2003 Apr 11;278(15):13286-93. DOI: 10.1074/jbc.M213005200

Информация об авторе:

Галкина Елена Вячеславовна, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142283, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск, ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 31-2156
 E-mail: elen12123@yandex.ru

Information about author:

Elena V. Galkina, reseacher of microbial collection department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 31-2156
 E-mail: elen12123@yandex.ru

НАУЧНЫЕ КОНФЕРЕНЦИИ**Зарубежные научные конференции**

February 12–14, 2018 Baltimore, MD	ASM Biothreats
February 25–27 Delhi, India	Big data in biomedicine
February 28–March 2 Cambridge, UK	Proteomics in Cell Biology and Disease Mechanisms
04–08 March Banff, Alberta, Canada	Manipulation of the Gut Microbiota for Metabolic Health
04–08 March Banff, Alberta, Canada	Microbiome, Host Resistance and Disease
06–08 March Cambridge, UK	Bioinformatics Resources for Protein Biology
11–16 March Ventura, CA, USA	Driving Antibacterial Discovery and Development to Address the Clinical Demands of the Next Decade
18–20 March Bristol, UK	54th BSMM Annual Scientific Meeting
28 March Birmingham, UK	ECS Research Symposium. Epidemiology and Infection Control
May 21–22 New York, USA	Bacteriology and Infectious Diseases
June 7–11 Atlanta, GA	ASM Microbe

Российские научные конференции

28–30 марта 2018 г.	VII Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» http://konferencii.ru/info/123101
19 апреля 2018 г.	XII Международная научно-практическая конференция «Научный форум: медицина, биология и химия» https://nauchforum.ru/conf/med/xii
17–18 мая 2018 г.	Всероссийская научно-практическая конференция «Микробиология: от микроскопа до геномного анализа» http://www.altaastra.com/events/microbiology-17-may-2018.html
23–25 мая 2018 г.	Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» http://www.biomos.ru/conference/
6–8 июня 2018 г.	Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения) http://mycology.szgmu.ru/congress2018/

Частота встречаемости и количественное содержание основных пародонтопатогенов при пародонтитах различной степени тяжести

К.Ю.Швец^{1,2}, Э.Р.Тамарова¹, А.Р.Мавзютов¹, А.И.Булгакова¹

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Российская Федерация

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» Минобрнауки России, Уфа, Российская Федерация

Цель исследования заключалась в анализе встречаемости основных пародонтопатогенных бактерий в пародонтальных карманах при пародонтитах различной степени тяжести и в зависимости от тактики ведения пациентов. Установлено, что при хроническом генерализованном пародонтите чаще обнаруживались виды *Streptococcus mutans* (на 40,6%, $\chi^2 = 32,2$, $p < 0,05$), *Streptococcus sobrinus* (на 39,1%, $\chi^2 = 30,2$, $p < 0,05$), *Streptococcus oralis* (на 31,4%, $\chi^2 = 18,9$, $p < 0,05$) и *Treponema denticola* (на 11,2%, $\chi^2 = 4,55$, $p < 0,05$) и ассоциации *Treponema denticola*-*Porphyromonas gingivalis* (на 13,3%, $\chi^2 = 4,4$, $p < 0,05$). При тяжелой форме в порядке убывания возрастала представленность *Porphyromonas gingivalis* ($\chi^2 = 10,5$, $p < 0,05$), *Streptococcus sobrinus* ($\chi^2 = 10,5$, $p < 0,05$), *Streptococcus salivarius* ($\chi^2 = 7,9$, $p < 0,05$), *Treponema denticola* ($\chi^2 = 7,7$, $p < 0,05$), *Streptococcus mutans* ($\chi^2 = 6,6$, $p < 0,05$) и *Streptococcus macacae* ($\chi^2 = 6,0$, $p < 0,05$). При включении в схему лечения Vector-терапии и антибактериальных препаратов достоверно снижалась частота выявления *Porphyromonas gingivalis* – на 18,6% ($\chi^2 = 11,6$, $p < 0,05$) и *Treponema denticola* – на 15,1% ($\chi^2 = 8,48$, $p < 0,05$). При использовании сконструированного нами калибратора pAL-TAstrSob16S на фоне системной антибиотикотерапии статистически значимо снижались концентрации *Porphyromonas gingivalis* (средняя концентрация – $2,1E+06$ копий ДНК/мл) и *Treponema denticola* (средняя концентрация – $1,2E+06$ копий ДНК/мл).

Ключевые слова: пародонтальный карман, ПЦР, *P. gingivalis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *T. denticola*, *S. mutans*, *S. macacae*

Для цитирования: Швец К.Ю., Тамарова Э.Р., Мавзютов А.Р., Булгакова А.И. Частота встречаемости и количественное содержание основных пародонтопатогенов при пародонтитах различной степени тяжести. Бактериология. 2017; 2(4): 40–45. DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-40-45

Frequency of occurrence and quantitative content of main parodontopathogenes at parodontitis of different degree of gravity

K.Yu.Shvets^{1,2}, E.R.Tamarova¹, A.R.Mavzyutov¹, A.I.Bulgakova¹

¹The Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation;

²The Bashkir State University, Ufa, Russian Federation

Aim of the study was analysis of occurrence of the main parodontopathogenic bacteria in the periodontal pockets with periodontitis of varying severity and depending on the tactics of patient management. It was found that in the case of chronic generalized periodontitis, the species of *Streptococcus mutans* were more frequently detected (by 40.6%, $\chi^2 = 32.2$, $p < 0.05$), *Streptococcus sobrinus* (by 39.1%, $\chi^2 = 30.2$, $p < 0.05$), *Streptococcus oralis* (31.4%, $\chi^2 = 18.9$, $p < 0.05$) and *Treponema denticola* (11.2%, $\chi^2 = 4.55$, $p < 0.05$) and associations *Treponema denticola*-*Porphyromonas gingivalis* (13.3%, $\chi^2 = 4.4$, $p < 0.05$). In severe cases we have obtained another results: *Porphyromonas gingivalis* ($\chi^2 = 10.5$, $p < 0.05$), *Streptococcus sobrinus* ($\chi^2 = 10.5$, $p < 0.05$), *Streptococcus salivarius* ($\chi^2 = 7.9$, $p < 0.05$), *Treponema denticola* ($\chi^2 = 7.7$, $p < 0.05$), *Streptococcus mutans* ($\chi^2 = 6.6$, $p < 0.05$), and *Streptococcus macacae* ($\chi^2 = 6.0$, $p < 0.05$). Under the treatment by using Vector-therapy and antibacterial drugs, the detection rate of *Porphyromonas gingivalis* was significantly decreased by 18.6% ($\chi^2 = 11.6$, $p < 0.05$) and *Treponema denticola* by 15.1% ($\chi^2 = 8.48$, $p < 0.05$). The concentrations of *Porphyromonas gingivalis* (average concentration of $2.1E + 06$ copies of DNA/ml) and *Treponema denticola* (average concentration of $1.2E + 06$ copies of DNA/ml) were statistically significantly lower against the background of systemic antibiotic therapy under the using the pAL-TAstrSob16S calibrator designed by authors.

Keywords: periodontal pocket, PCR, *P. gingivalis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *T. denticola*, *S. mutans*, *S. macacae*

For citation: Shvets K.Yu., Tamarova E.R., Mavzyutov A.R., Bulgakova A.I. Frequency of occurrence and quantitative content of main parodontopathogenes at parodontitis of different degree of gravity. Bacteriology. 2017; 2(4): 40–45. (In Russian). DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-40-45

Для корреспонденции:

Мавзютов Айрат Радикович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Адрес: 450008, Уфа, ул. Ленина, 3
Телефон: (347) 276-1960
E-mail: ufalab@mail.ru

Статья поступила 11.10.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Airat R. Mavzyutov, MD, PhD, DSc, professor, chief of department of fundamental and applied microbiology, Bashkir State Medical University

Address: 3 Lenina str., Ufa, 450008, Russian Federation
Phone: (347) 276-1960
E-mail: ufalab@mail.ru

The article was received 11.10.2017, accepted for publication 22.12.2017

Воспалительная патология пародонта занимает второе место в мире по распространенности среди стоматологических заболеваний [1, 2] и не имеет тенденции к снижению [3]. При этом микроорганизмы полости рта оказывают существенное влияние не только на течение воспалительного процесса в тканях пародонта, но и на течение общесоматической патологии [4–8].

В связи с этим характеристика микробиоты пародонтальных карманов имеет большое научно-практическое значение, но остается серьезной проблемой, что обусловлено, с одной стороны, физиологическими особенностями пародонтопатогенных бактерий, а с другой – отсутствием стандартных воспроизводимых методических подходов для анализа содержимого пародонтальных карманов. Однако в последние годы, благодаря все более широкому применению полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в стоматологии, обозначились реальные перспективы при решении указанных задач [9] и были предложены способы получения количественных данных о микробиоте пародонтальных карманов [10]. Это обстоятельство открывает, на наш взгляд, принципиально новые возможности как для диагностической оценки этиологической значимости условно-патогенных пародонтопатогенов, так и для оценки эффективности методов и/или проводимого лечения.

Цель исследования – сравнительная оценка частоты встречаемости и количественных данных о содержании основных пародонтопатогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов при пародонтитах различной степени тяжести и в зависимости от тактики ведения пациентов.

Материалы и методы

В основу работы положены результаты комплексного обследования 170 больных пародонтитом (основная группа), находившихся на амбулаторном лечении в ГКУЗ РБ РКБ №2 (г. Уфа) в период с 2012 по 2016 гг. У 129 (75,9%) пациентов был диагностирован пародонтит средней степени тяжести, у 41 (24,1%) пациента – тяжелая степень пародонтита.

Контрольная группа была представлена 66 пациентами (26 мужчин и 40 женщин, средний возраст $45,3 \pm 7,62$ лет) без патологии пародонта после санации полости рта.

Диагноз заболевания устанавливали в соответствии с критериями классификации заболеваний пародонта, принятой на заседании Президиума секции пародонтологии Стоматологической ассоциации России в 2001 г., на основе Международной классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем (МКБ-10) [11].

Все проведенные исследования соответствовали этическим нормам Хельсинкской декларации (2013 г.) и Федеральному закону Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан Российской Федерации». Протокол исследования был одобрен комитетом по этике Башкирского государственного медицинского университета. Каждый пациент давал согласие на участие в исследовании и получал подробную информацию о его результатах.

У всех больных основной и контрольной групп было проведено молекулярно-генетическое исследование с целью

обнаружения пародонтопатогенных видов *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus macacae*, рассматриваемых в настоящее время в качестве наиболее информативных «маркерных» пародонтопатогенов [6, 12–14].

Материал для молекулярно-генетического исследования – содержимое пародонтальных карманов зубов. Содержимое пародонтального кармана отбирали следующим образом. Первоначально пациенты трехкратно полощали полость рта физиологическим раствором натрия хлорида. Затем ротовую жидкость собирали путем сплевывания в стерильную пробирку типа Eppendorf (1,5 мл), а далее вводили пинцетом стерильный бумажный эндодонтический штифт (размер №25) в наиболее глубокие участки пародонтальных карманов на 10 с с последующим помещением в стерильную пластиковую пробирку типа Eppendorf (1,5 мл), содержащую 1 мл физиологического раствора. Забор проводили в двух повторностях для каждого пациента. Хранили и транспортировали образцы в лабораторию при +4°C в течение 2 ч. Транспортировку партий проб в лабораторию осуществляли в термоконтейнерах с хладагентом. Молекулярно-генетическое исследование у пациентов проводилось дважды – до и через 10 дней лечения по описанной схеме.

ДНК бактерий выделяли из 50 мкл клинического материала (содержимое пародонтального кармана) с использованием ионообменной смолы Chelex100.

Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали подобранные и апробированные пары видоспецифичных праймеров к участкам ДНК *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus macacae* и реакционную смесь ПЦР-Микс SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ»). ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch «REAL TIME» (Bio-Rad, США). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Прибор калибровали тремя разведениями калибровочных образцов, приготовленных путем серийного разведения плазмиды pAL-TAStrSob16S известной концентрации.

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась с помощью биометрических методов анализа [15, 16]. Методы описательной статистики заключались в оценке среднего арифметического (M), средней ошибки среднего значения (m) – для признаков, имеющих непрерывное распределение, а также частоты встречаемости – для признаков с дискретным значением.

Для анализа признаков, подчиняющихся закону нормального распределения, применяли метод выявления различия признаков по средним величинам. Достоверность различий определяли с помощью t -критерия Стьюдента. Для анализа распределения частот признаков, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали критерий χ^2 . Для определения наличия взаимосвязи между двумя признаками применялся коэффициент корреляции r , который рассчитывался методом непараметрической статистики Спирмена. Результаты считались достоверными при $p < 0,05$.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного пакета Statistica 7.0, руководствуясь пособием Трухачевой Н.В. по методам статистической обработки данных в биологии и медицине [17].

Результаты и обсуждение

Оценка частоты встречаемости пародонтопатогенных микроорганизмов у больных пародонтитом различных степеней тяжести

В ходе анализа частоты встречаемости основных пародонтопатогенов (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus* и *Streptococcus macacae*) [6] было установлено, что у больных хроническим генерализованным пародонтитом в содержимом пародонтальных карманов обнаруживались все указанные виды бактерий. Однако существенно чаще, в сравнении с пациентами без патологии пародонта в группе контроля, у больных пародонтитом вне дифференцирования

по степени тяжести обнаруживались виды *Streptococcus mutans* (на 40,6%, $\chi^2 = 32,2$, $p < 0,05$), *Streptococcus sobrinus* (на 39,1%, $\chi^2 = 30,2$, $p < 0,05$), *Streptococcus oralis* (на 31,4%, $\chi^2 = 18,9$, $p < 0,05$) и *Treponema denticola* (на 11,2%, $\chi^2 = 4,55$, $p < 0,05$), а среди микробных ассоциаций у больных пародонтитом достоверно возрастала сочетанная встречаемость видов *Treponema denticola* и *Porphyromonas gingivalis* (на 13,3%, $\chi^2 = 4,4$, $p < 0,05$) при сопоставлении с группой сравнения.

У больных с тяжелой формой заболевания в содержимом пародонтальных карманов в порядке убывания обнаружено существенное возрастание, в сравнении с таковым у здоровых лиц, представленности *Porphyromonas gingivalis* ($\chi^2 = 10,5$, $p < 0,05$), *Streptococcus sobrinus* ($\chi^2 = 10,5$, $p < 0,05$), *Streptococcus salivarius* ($\chi^2 = 7,9$, $p < 0,05$), *Treponema denticola* ($\chi^2 = 7,7$, $p < 0,05$), *Streptococcus mutans* ($\chi^2 = 6,6$, $p < 0,05$) и *Streptococcus macacae* ($\chi^2 = 6,0$, $p < 0,05$) (табл. 1).

По результатам исследований, у пациентов с пародонтитом средней степени тяжести статистически значимые различия в частоте встречаемости бактерий в сравнении с контрольной группой выявлены только для *Streptococcus mutans* ($\chi^2 = 37,6$, $p < 0,05$), *Streptococcus sobrinus* ($\chi^2 = 33,4$, $p < 0,05$) и *Streptococcus oralis* ($\chi^2 = 23,9$, $p < 0,05$). Сравнительный анализ данных молекулярно-генетических исследований содержимого пародонтальных карманов пациентов с разными степенями тяжести пародонтита позволил выявить, что для таких пациентов характерны различия в составе микробиоценозов пародонтальных карманов. Было установлено, что у пациентов с тяжелой степенью пародонтита в сравнении с группой пациентов со средней степенью тяжести достоверно чаще встречаются виды *Streptococcus macacae* ($\chi^2 = 13,3$, $p < 0,05$), *Streptococcus salivarius* ($\chi^2 = 9,14$, $p < 0,05$), *Streptococcus sanguis* ($\chi^2 = 7,67$, $p < 0,05$), *Streptococcus oralis* ($\chi^2 = 6,69$, $p < 0,05$) и *Porphyromonas gingivalis* ($\chi^2 = 4,58$, $p < 0,05$).

Анализ ассоциативных связей между пародонтопатогенными микроорганизмами у больных пародонтитом различных степеней тяжести

По литературным данным [3, 18, 19] известно, что бактерии суббиотопов полости рта, в частности пародонтальных карманов, наиболее часто представлены в микробных ассоциациях, образованных облигатно- и факультативно-анаэробными микроорганизмами, играющими важнейшую роль в утяжелении воспалительного процесса в тканях пародонта. Соответственно анализ наличия ассоциативных связей между пародонтопатогенными микроорганизмами у больных пародонтитом является важным диагностическим инструментом при мониторинге и прогнозировании течения заболевания, при определении тактики дальнейшего ведения больного. Именно поэтому нами был проведен анализ на предмет наличия ассоциативных связей между пародонтопатогенными видами у пациентов со средней и тяжелой степенями тяжести пародонтита.

У больных пародонтитом средней степени тяжести в сравнении с группой пациентов с интактным пародонтом в содержимом пародонтальных карманов достоверно чаще остальных выявлялись ассоциации *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis* ($\chi^2 = 17,61$, $p < 0,05$),

Таблица 1. Частота выделения условно-патогенных бактерий в содержимом пародонтального кармана у больных пародонтитом основной группы (n = 86)

Виды бактерий	Исходно		ч/з 14 дней	
	абс.	%	абс.	%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	21	24,4 $\chi^2 = 11,6$, $p = 0,001$	5 ^a	5,8
<i>Treponema denticola</i>	18	20,9 $\chi^2 = 8,48$, $p = 0,005$	5 ^a	5,8
<i>Streptococcus mutans</i>	58	67,4 $\chi^2 = 6,78$, $p = 0,017$	41 ^a	47,7
<i>Streptococcus salivarius</i>	9	10,5 $\chi^2 = 1,24$, $p = 0,373$	5	5,8
<i>Streptococcus sanguis</i>	53	61,6 $\chi^2 = 8,03$, $p = 0,011$	35 ^a	40,7
<i>Streptococcus oralis</i>	48	55,8 $\chi^2 = 9,43$, $p = 0,002$	28 ^a	32,6
<i>Streptococcus macacae</i>	10	11,6 $\chi^2 = 1,10$, $p = 0,436$	6	7,0
<i>Streptococcus sobrinus</i>	47	54,7 $\chi^2 = 12,68$, $p = 0,001$	24 ^a	27,9

Примечание: ^a – различие со значением до лечения достоверно ($p < 0,05$).

Таблица 2. Частота выделения условно-патогенных бактерий в содержимом пародонтального кармана у больных пародонтитом группы сравнения (n = 84)

Виды бактерий	Исходно		ч/з 14 дней	
	абс.	%	абс.	%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	20	23,8 $\chi^2 = 5,04$, $p = 0,040$	9 ^a	10,7
<i>Treponema denticola</i>	14	16,7 $\chi^2 = 6,22$, $p = 0,023$	4 ^a	4,8
<i>Streptococcus mutans</i>	60	71,4 $\chi^2 = 5,01$, $p = 0,033$	46 ^a	54,8
<i>Streptococcus salivarius</i>	10	11,9 $\chi^2 = 1,83$, $p = 0,277$	5	6,0
<i>Streptococcus sanguis</i>	45	53,6 $\chi^2 = 4,71$, $p = 0,036$	31 ^a	36,9
<i>Streptococcus oralis</i>	44	52,4 $\chi^2 = 1,53$, $p = 0,279$	36 ^a	42,9
<i>Streptococcus macacae</i>	9	10,7 $\chi^2 = 0,66$, $p = 0,626$	6	7,1
<i>Streptococcus sobrinus</i>	40	47,6 $\chi^2 = 1,98$, $p = 0,241$	31	36,9

Примечание: ^a – различие со значением до лечения достоверно ($p < 0,05$).

Porphyromonas gingivalis, *Treponema denticola* ($\chi^2 = 13,15$, $p < 0,05$), *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* ($\chi^2 = 9,84$, $p < 0,05$).

У больных тяжелой формой пародонтита наблюдалась значимо более высокая, чем у пациентов с пародонтитом средней степени и у здоровых лиц, частота встречаемости ассоциаций микроорганизмов *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* ($\chi^2 = 16,7$, $p < 0,05$), *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis* ($\chi^2 = 11,05$, $p < 0,05$).

Качественная оценка содержания пародонтопатогенных микроорганизмов в клинических образцах

На фоне проводимого лечения у больных как основной группы, так и группы сравнения отмечалось определенное уменьшение представленности всех изученных пародонто-

патогенных микроорганизмов. В основной группе больных в ходе комплексной терапии, включавшей Vector-терапию и антибактериальные препараты, обращает на себя внимание достоверное снижение частоты выявления в содержимом пародонтальных карманов *Porphyromonas gingivalis* – на 18,6% ($\chi^2 = 11,6$, $p < 0,05$) и *Treponema denticola* – на 15,1% ($\chi^2 = 8,48$, $p < 0,05$) (см. табл. 1).

У больных группы сравнения, которым Vector-терапия не назначалась, наблюдалось существенное снижение частоты выделения в содержимом пародонтального кармана *Streptococcus mutans* – на 16,6% ($\chi^2 = 5,01$, $p < 0,05$), *Streptococcus sanguis* – на 16,6% ($\chi^2 = 4,71$, $p < 0,05$), *Porphyromonas gingivalis* – на 13,1% ($\chi^2 = 5,04$, $p < 0,05$) и *Treponema denticola* – на 11,9% ($\chi^2 = 6,22$, $p < 0,05$) (табл. 2). Изменения в содержании других видов были незначительными. Так, если в основной группе частота представленности *Streptococcus oralis* и *Streptococcus sobrinus* достоверно снизилась по сравнению с уровнями, предшествовавшими лечению, то в группе сравнения изменения частоты выявления указанных бактерий были незначительными. При этом включение в комплексную терапию пародонтита лечения аппаратом Vector способствовало более значительному снижению распространенности *Streptococcus oralis* и *Streptococcus sobrinus* в содержимом пародонтального кармана – соответственно на 23,2% ($\chi^2 = 9,43$, $p < 0,05$) и 26,8% ($\chi^2 = 12,68$, $p < 0,05$).

При изучении динамики изменения микробиоты в содержимом пародонтального кармана в зависимости от степени тяжести пародонтита в обеих группах больных установлено значимое снижение представленности большинства микроорганизмов (табл. 3). Так, у пациентов основной группы с пародонтитом средней степени тяжести частота встречаемости *Porphyromonas gingivalis* была ниже показателей до начала лечения на 15,6% ($\chi^2 = 6,46$, $p < 0,05$), а *Treponema denticola* – на 12,5% ($\chi^2 = 5,89$, $p < 0,05$). Среди представителей рода *Streptococcus spp.* наиболее выраженные изменения были обнаружены для видов *Streptococcus sobrinus* – снижение на 31,3% ($\chi^2 = 12,70$, $p < 0,05$), *Streptococcus oralis* – на 28,1% ($\chi^2 = 10,16$, $p < 0,05$), *Streptococcus sanguis* – на 23,5% ($\chi^2 = 7,17$, $p < 0,05$) и *Streptococcus mutans* – на 20,3% ($\chi^2 = 5,68$, $p < 0,05$). Частота выделения пародонтопатогенов *Streptococcus salivarius* и *Streptococcus macacae* осталась практически без изменений, однако следует отметить, что их встречаемость до лечения среди данного контингента больных была низкой и не превышала 6,3%.

У пациентов основной группы с тяжелой формой заболевания в содержимом пародонтальных карманов достовер-

Таблица 3. Частота выделения бактерий в содержимом пародонтального кармана у больных пародонтитом средней и тяжелой степеней в зависимости от тактики лечения

Параметры	Основная группа		Группа сравнения	
	исходно	ч/з 14 дней	исходно	ч/з 14 дней
Пародонтит средней степени тяжести				
Количество больных	64		65	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	14 (21,9%)	4 (6,3%) ^a	12 (18,5%)	6 (9,2%)
<i>Treponema denticola</i>	10 (15,6%)	2 (3,1%) ^a	9 (13,8%)	2 (3,1%) ^a
<i>Streptococcus mutans</i>	47 (73,4%)	34 (53,1%) ^a	49 (75,4%)	37 (56,9%) ^a
<i>Streptococcus salivarius</i>	4 (6,3%)	3 (4,7%)	4 (6,2%)	1 (1,5%)
<i>Streptococcus sanguis</i>	44 (68,8%)	29 (45,3%) ^a	38 (58,5%)	25 (38,5%) ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	39 (60,9%)	21 (32,8%) ^a	38 (58,5%)	31 (47,7%)
<i>Streptococcus macacae</i>	3 (4,7%)	2 (3,1%)	5 (7,7%)	3 (4,6%)
<i>Streptococcus sobrinus</i>	38 (59,4%)	18 (28,1%) ^a	33 (50,8%)	26 (40,0%)
Тяжелая степень пародонтита				
Количество больных	22		19	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	7 (31,8%)	1 (4,5%) ^a	8 (42,1%)	3 (15,8%) ^a
<i>Treponema denticola</i>	8 (36,4%)	3 (13,6%) ^a	5 (26,3%)	2 (10,5%)
<i>Streptococcus mutans</i>	11 (50,0%)	7 (31,8%)	11 (57,9%)	9 (47,4%)
<i>Streptococcus salivarius</i>	5 (22,7%)	2 (9,1%)	6 (31,6%)	4 (21,1%)
<i>Streptococcus sanguis</i>	9 (40,9%)	6 (27,3%)	7 (36,8%)	6 (31,6%)
<i>Streptococcus oralis</i>	9 (40,9%)	7 (32,8%)	6 (31,6%)	5 (26,3%)
<i>Streptococcus macacae</i>	7 (31,8%)	4 (18,2%)	4 (21,1%)	3 (15,8%)
<i>Streptococcus sobrinus</i>	9 (40,9%)	6 (27,3%)	7 (36,8%)	5 (26,3%)

Примечание: ^a – различие со значением до лечения достоверно ($p < 0,05$).

Таблица 4. Абсолютное количество патогенных и условно-патогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов у больных хроническим генерализованным пародонтитом (копий ДНК/мл)

Вид бактерии	Основная группа		Группа сравнения	
	до лечения	ч/з 10 дней	до лечения	ч/з 10 дней
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1,1E + 07	5,7E + 06 ^a	7,2E + 07	2,1E + 06 ^a
<i>Treponema denticola</i>	2,5E + 07	4,8E + 06 ^a	6,3E + 07	1,2E + 06 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	2,4E + 08	9,7E + 07 ^a	3,8E + 08	4,7E + 07
<i>Streptococcus sanguis</i>	4,3E + 08	1,7E + 06 ^a	4,7E + 08	4,7E + 06
<i>Streptococcus sobrinus</i>	4,4E + 08	8,8E + 06 ^a	5,4E + 08	2,1E + 06
<i>Streptococcus mutans</i>	1,6E + 09	7,7E + 07 ^a	2,7E + 09	3,9E + 07
<i>Streptococcus salivarius</i>	4,1E + 08	1,3E + 06 ^a	1,2E + 09	8,7E + 06
<i>Streptococcus macacae</i>	3,5E + 09	7,9E + 07 ^a	7,3E + 07	3,5E + 06

Примечание: ^a – достоверность различий показателей в процессе лечения ($p < 0,05$).

ные различия с показателями до лечения выявлены для *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* – ниже соответственно на 27,3% ($\chi^2 = 5,50, p < 0,05$) и 22,8% ($\chi^2 = 5,26, p < 0,05$). Необходимо отметить заметное снижение представленности в содержимом пародонтального кармана *Streptococcus mutans* (на 13,6%, $\chi^2 = 3,76, p < 0,05$), однако эти различия были статистически незначимы и носили характер тенденции.

Для пациентов группы сравнения со средней степенью пародонтита в содержимом пародонтального кармана установлено существенное снижение представленности бактерий *Streptococcus sanguis* – на 20,0% ($\chi^2 = 5,20, p < 0,05$), *Streptococcus mutans* – на 18,5% ($\chi^2 = 4,95, p < 0,05$) и *Treponema denticola* – на 10,7% ($\chi^2 = 4,87, p < 0,05$).

У пациентов данной группы с тяжелой формой заболевания пародонтита обращает на себя внимание уменьшение встречаемости *Porphyromonas gingivalis* (на 26,3%, $\chi^2 = 13,75, p < 0,05$) и *Treponema denticola* (на 21,1%, $\chi^2 = 11,04, p < 0,05$), однако эти различия с исходными показателями оказались недостоверными, что, вероятно, обусловлено небольшим объемом выборки (19 человек). В то же время суммарное снижение представленности указанных микроорганизмов было статистически значимым – на 47,4% ($\chi^2 = 8,53, p < 0,05$).

Таким образом, проведение молекулярно-генетических исследований у больных пародонтитом позволило оценить бактериостатический эффект проводимого лечения и доказать целесообразность включения в состав базовой антибактериальной терапии заболевания ультразвуковой обработки зубодесневых карманов и поверхности корня с помощью аппарата Vector.

Количественная оценка содержания пародонтопатогенных микроорганизмов в клинических образцах

Количественная оценка содержания условно-патогенных микроорганизмов является одним из наиболее широко применяемых способов оценки их этиологической значимости, обязательной для диагностики инфекционно-воспалительных процессов, в том числе в тканях пародонта. Однако для получения указанных количественных данных методом ПЦР в режиме реального времени при пародонтите до настоящего времени существовали определенные технические сложности по стандартизации исследования, обусловленные трудностью извлечения и измерения количества содержимого пародонтальных карманов.

В этой связи нами был разработан способ получения клинических образцов известного объема [10], а также сконструирован калибровочный образец pAL-TASrSob16S с известной концентрацией (копий ДНК/мл) для получения достоверных результатов при диагностике пародонтита. Количественное содержание бактерий в выравненных по объему клинических образцах определяли методом ПЦР в режиме реального времени в приборе, откалиброванном тремя разведениями рекомбинантной плазмиды pAL-TASrSob16S, что позволяло определять абсолютное количество копий ДНК возбудителя в клиническом образце (копий ДНК/мл).

В группе больных, проходивших курс системной антибиотикотерапии, наблюдалось статистически значимое сниже-

ние концентрации пародонтопатогенов *Porphyromonas gingivalis* (средняя концентрация – $2,1E + 06$ копий ДНК/мл) и *Treponema denticola* (средняя концентрация – $1,2E + 06$ копий ДНК/мл) (табл. 4).

Таким образом, полученные при использовании молекулярно-генетических методов количественные данные о видовом составе пародонтопатогенных бактерий позволяют в известной степени объективно оценить эффективность проводимого лечения (в нашем случае ультразвука) и микробиологические особенности хронических генерализованных пародонтитов различных степеней тяжести, повысить обоснованность антибиотикотерапии и, соответственно, снизить риски селекции антибиотикорезистентных вариантов.

Продолжение исследований в обозначенной области будет способствовать накоплению количества данных, достаточных для получения статистически достоверных значений, необходимых для разработки референсных интервалов и включения их в соответствующие протоколы и/или стандарты оказания медицинской помощи пациентам с данной патологией.

Литература

- Costa FO, Susin C, Cortelli JR, Pordeus IsA. Epidemiology of Periodontal Disease. Int J Dent. 2012;2012:848641. DOI: 10.1155/2012/848641.
- Hatem AE. Epidemiology and risk factors of periodontal disease. In: Periodontal Diseases a clinician's guide. Dr. Jane Manakil (Ed.), 2012, pp. 213-230.
- Янушевич ОО, Дмитриева ЛА, Ревазова ЗЗ. Пародонтит. XXI век. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016.
- Тамарова ЭР, Мавзютов АР. Исследование распространенности соматической патологии у больных пародонтитом. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2013;3:53-6.
- Тамарова ЭР, Мавзютов АР. Клинико-лабораторные параллели между видовым составом микробиоты полости рта и общесоматической патологией у больных пародонтитом. Пермский медицинский журнал. 2014;31(6):68-73.
- Царев ВН, Давыдова ММ, Николаева ЕН. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016.
- AlJehani Y. A. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. Int J Dent. 2014;2014:182513. DOI: 10.1155/2014/182513.
- Borgnakke WS, Ylostalo PV, Taylor GW, Genco RJ. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. J Clin Periodontol. 2013 Apr;40 Suppl 14:S135-52. DOI: 10.1111/jcpe.12080.
- Царев ВН, Николаева ЕН, Ягодина ЕВ, Трефилова ЮА, Ипполитов ЕВ. Молекулярные методы диагностики гингивита и пародонтита у ВИЧ-инфицированных пациентов. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(1): 54-59.
- Тамарова ЭР, Мавзютов АР, Баймиев АХ, Швец КЮ. Способ количественного определения видового состава микробиоты пародонтальных карманов. Патент на изобретение RUS 2612023 24.12.2015
- Григорьян АС, Грудянов АИ, Рабухина НА, и др. Болезни пародонта. М., 2005.
- Грудянов АИ, Овчинникова ВВ. Частота выявления различных представителей пародонтопатогенной микрофлоры при пародонтите разной степени. Стоматология. 2009;88(3):34-7.
- Miyamoto E, Nakano K, Fujita K, Nomura R, Okawa R, Matsumoto M, Ooshima T. Bacterial profiles of oral streptococcal and periodontal bacterial species in saliva specimens from Japanese subjects. Arch Oral Biol. 2009 Apr;54(4):374-9. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2009.01.010
- Wade WG. The oral microbiome in health and disease. Pharmacol Res. 2013 Mar;69(1):137-43. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.11.006.

15. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. М., 2006.
16. Реброва ОЮ. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера, 2006.
17. Трухачева НВ. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013
18. Зорина ОА, Беркутова ИС, Рехвиашвили БА, Аймадинова НК. Сравнительная характеристика микробиоценозов пародонтальных карманов при хроническом генерализованном и агрессивном пародонтите до и после комплексного лечения. Российский стоматологический журнал. 2013;1:27-31.
19. Тамарова ЭР, Баймиев АХ, Швец КЮ, Мавзютов АР. Молекулярно-генетическая характеристика видового состава микробиоты слюны и десневых карманов при пародонтите. Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(12):56-9.
- specimens from Japanese subjects. Arch Oral Biol. 2009 Apr;54(4):374-9. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2009.01.010
14. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. Pharmacol Res. 2013 Mar;69(1):137-43. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.11.006.
15. Nasledov A. SPSS komp'yuternyi analiz dannykh v psikhologii i sotsial'nykh naukakh [SPSS computer data analysis in psychology and social sciences]. Moscow, 2006. (In Russian).
16. Rebrova OYu. Statisticheskii analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA [Statistical analysis of medical data. Application of the STATISTICA software package]. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ., 2006. (In Russian).
17. Trukhacheva NV. Matematicheskaya statistika v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s primeneniem paketa Statistica [Mathematical statistics in biomedical research using the Statistica package]. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ., 2013 (In Russian).
18. Zorina OA, Berkutova IS, Rekhviashvili BA, Aymadinova NK. Comparative characteristics of microbiocenoses of the periodontal pocket with chronic generalized periodontitis and aggressive periodontitis before and after the treatment. Rossiiskii Stomatologicheskii Zhurnal (Russian Journal of Dentistry). 2013;1:27-31. (In Russian).
19. Tamarova ER, Baimiev AKh, Shvets KYu, Mavzyutov AR. The molecular genetic characteristic of species content of saliva and gingival recess under periodontitis. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2015;60(12):56-9. (In Russian).

References

1. Costa FO, Susin C, Cortelli JR, Pordeus IsA. Epidemiology of Periodontal Disease. Int J Dent. 2012;2012:848641. DOI: 10.1155/2012/848641.
2. Hatem AE. Epidemiology and risk factors of periodontal disease. In: Periodontal Diseases a clinician's guide. Dr. Jane Manakil (Ed.), 2012, pp. 213-230.
3. Yanushevich OO, Dmitrieva LA, Revazova ZE. Parodontit. XXI vek [Periodontitis. XXI century]. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ., 2016. (In Russian).
4. Tamarova ER, Mavzutov AR. Study of the prevalence of somatic pathology among patients with periodontitis. Kursk scientific and practical bulletin «Man and his health». 2013;3:53-6. (In Russian).
5. Tamarova R, Mavzyutov AR. Clinicolaboratory parallels between species composition of oral microbiota and general somatic pathology in patients with periodontitis. Perm Medical Journal (Permskii meditsinskiy zhurnal). 2014; 31(6):68-73. (In Russian).
6. Tsarev VN, Davydova MM, Nikolaeva EN. Mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya polosti rta [Microbiology, virology and immunology of the oral cavity]. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ., 2016. (In Russian).
7. AlJehani Y. A. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. Int J Dent. 2014;2014:182513. DOI: 10.1155/2014/182513.
8. Borgnakke WS, Ylostalo PV, Taylor GW, Genco RJ. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. J Clin Periodontol. 2013 Apr;40 Suppl 14:S135-52. DOI: 10.1111/jcpe.12080.
9. Tsarev VN, Nikolaeva EN, Iagodina EV, Trefilova YuA, Ippolitov EV. The molecular techniques of diagnostic of gingivitis and periodontitis in HIV-infected patients. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2016; 61(1):54-59. (In Russian).
10. Tamarova ER, Mavzyutov AR, Baimiev AKh, Shvets KYu. Method for quantitative determination of species composition of microbiota of periodontal pockets. Patent for invention RUS 2612023 24.12.2015 (In Russian).
11. Grigor'yan AC, Grudyanov AI, Rabukhina HA, et al. Bolezni parodonta [Periodontal disease]. Moscow, 2005. (In Russian).
12. Grudyanov AI, Ovchinnikova VV. Frequency of revelation of different representatives of parodontopathogenic microflora in cases of parodontitis of different severity. Stomatologiya (Stomatology). 2009;88(3):34-7. (In Russian).
13. Miyamoto E, Nakano K, Fujita K, Nomura R, Okawa R, Matsumoto M, Ooshima T. Bacterial profiles of oral streptococcal and periodontal bacterial species in saliva

Информация об авторах:

Швец Ксения Юрьевна, ассистент кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России
 Адрес: 450008, Уфа, ул. Ленина, 3
 Телефон: (347) 276-1960
 E-mail: kseniya.shvets@yandex.ru

Тамарова Эльмира Рифовна, аспирант кафедры пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний, кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России
 Адрес: 450008, Уфа, ул. Ленина, 3
 Телефон: (347) 272-4173
 E-mail: tamarovufa2@mail.ru

Булгакова Альбина Ирековна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России
 Адрес: 450008, Уфа, ул. Ленина, 3
 Телефон: (347) 272-4173

Information about authors:

Kseniya Yu. Shvets, assistant department of fundamental and applied microbiology, Bashkir State Medical University
 Address: 3 Lenina str., Ufa, 450008, Russian Federation
 Phone: (347) 276-1960
 E-mail: kseniya.shvets@yandex.ru

Elmira R. Tamarova, postgraduate student, department of propaedeutics and physiotherapy of dental diseases, department of fundamental and applied microbiology, Bashkir State Medical University
 Address: 3 Lenina str., Ufa, 450008, Russian Federation
 Phone: (347) 272-4173
 E-mail: tamarovufa2@mail.ru

Al'bina I. Bulgakova, MD, PhD, DSc, professor, head of the department of propaedeutics and physiotherapy of dental diseases, Bashkir State Medical University
 Address: 3 Lenina str., Ufa, 450008, Russian Federation
 Phone: (347) 272-4173

Электрооптический анализ как средство контроля за внешними воздействиями на клетки бактерий

А.Г.Волошин¹, В.Д.Бунин², В.В.Веревкин¹, С.Г.Игнатов¹

¹ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;

²EloSystems GbR, Henningsdorf, Germany

С помощью электрооптического анализа изучали воздействия на бактериальные клетки факторов, влияющих на жизнеспособность микроорганизмов, целостность их оболочек и внутриклеточный метаболизм. Показано, что повреждающие факторы (тепло, спирт, бактериофаг и грамицидин С) драматически меняют характерную для живых бактерий частотную дисперсию анизотропии поляризуемости, регистрируемую с помощью электрооптического метода. В то же время разобщитель окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенол и наличие/отсутствие аэрации влияли на этот параметр не столь сильно. Полученные результаты позволяют рекомендовать электрооптический анализ для мониторинга состояния бактериальной культуры в биотехнологии.

Ключевые слова: электрооптический анализ, повреждающие факторы, *E. coli*

Для цитирования: Волошин А.Г., Бунин В.Д., Веревкин В.В., Игнатов С.Г. Электрооптический анализ как средство контроля за внешними воздействиями на клетки бактерий. Бактериология. 2017; 2(4): 46–49. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-46-49

Electro-optical analysis as a means to control external impacts on bacterial cells

A.G.Voloshin¹, V.D.Bunin², V.V.Verevkin¹, S.G.Ignatov¹

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

²EloSystems GbR, Henningsdorf, Germany

Factors influencing bacterial cells, the viability of microorganisms, their membrane integrity and intracellular metabolism were studied by using an electro-optical analysis. It is shown that adverse effects (heat, alcohol, bacteriophage and gramicidin C) dramatically change the frequency dispersion of polarizability anisotropy specific for living bacteria, which is registered by the electro-optical method. At the same time 2,4-dinitrophenol, uncoupling oxidative phosphorylation, as well as the presence/absence of aeration, do not affect the parameter so much. The obtained results allow us to recommend the electro-optical analysis for monitoring bacterial culture conditions in biotechnology.

Keywords: electro-optical analysis, damaging factors, *E. coli*

For citation: Voloshin A.G., Bunin V.D., Verevkin V.V., Ignatov S.G. Electro-optical analysis as a means to control external impacts on bacterial cells. Bacteriology. 2017; 2(4): 46–49. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-46-49

При выполнении биотехнологических процедур возникает потребность оценки физиологического состояния биологического материала, которое естественным образом меняется как в процессе культивирования, так и при дальнейших возможных операциях – концентрировании, сушке, хранении. Классические методы не всегда информативны (световая микроскопия) или требуют больших затрат времени (высевы с последующим анализом выросших культур).

Для корреспонденции:

Волошин Александр Григорьевич, кандидат биологических наук, старший 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) 36-0773
E-mail: voloshinag@mail.ru

Статья поступила 24.10.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

Современные приборные методы (масс-спектрометрия, ЯМР, атомная силовая микроскопия) очень дороги и не всегда адекватны поставленным задачам. В качестве одного из возможных подходов мы предлагаем использовать электрооптический анализ как метод контроля физиологического состояния клеток микроорганизмов.

В основе электрооптического метода лежит поляризация частиц, суспендированных в низкопроводящей жидкости

For correspondence:

Alexander G. Voloshin, PhD (Biol.), Senior Researcher of the Bionanotechnology Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0773
E-mail: voloshinag@mail.ru

The article was received 24.10.2017, accepted for publication 22.12.2017

под воздействием переменного электромагнитного поля. Это происходит вследствие появления индуцированных зарядов на поверхности частиц. Их распределение и величина определяются действующим механизмом поляризуемости [1, 2]. Объемный механизм поляризуемости характеризуется появлением индуцированных зарядов на границах раздела сред с различными комплексными диэлектрическими проницаемостями. Величина индуцированных на границах раздела зарядов пропорциональна напряженности электрического поля и зависит от соотношения комплексных диэлектрических проницаемостей структур. Для живой клетки, в том числе бактериальной, такими границами раздела являются поверхности соприкосновения цитоплазматической мембраны с внешней средой, а также мембраны с цитоплазмой. Роль клеточной стенки здесь минимальна, поскольку величина ее диэлектрической проницаемости практически совпадает с величиной диэлектрической проницаемости внешней среды.

Распределяясь по объему клетки, индуцированные заряды разных знаков образуют диполь. Диполь взаимодействует с электрическим полем и вызывает появление вращающего момента, который также пропорционален напряженности электрического поля. Появляется преобладающее направление ориентации клеток, причем степень их ориентации пропорциональна квадрату напряженности электрического поля.

Воздействие поля изменяет функцию распределения клеток по углам ориентации относительно исходной равновероятной. При этом происходит изменение всех оптических характеристик суспензии и, в частности, характера светорассеяния. Регистрация изменений оптической плотности оказывается технически наиболее простым методом количественной оценки этого процесса. Причиной изменения оптической плотности является изменение усредненного сечения рассеяния ориентированных клеток относительно усредненного сечения неориентированных клеток.

Использование электрооптического анализа в микробиологии началось в 80-х годах прошлого века [3, 4]. Тогда этот метод применялся для оценки выживаемости бактерий после экстремальных воздействий. Позднее с помощью электрооптики контролировали процесс культивирования [5]

и проводили идентификацию микроорганизмов [6, 7]. В настоящей работе электрооптический анализ используется для оценки состояния бактериальных клеток после некоторых внешних воздействий.

Внешние воздействия на бактериальные клетки – от условий культивирования до различных повреждающих факторов – приводят к изменению физико-химических параметров клеточных структур, что вызывает изменение поляризационных свойств клеток. Эти изменения и регистрируются с помощью электрооптического метода.

Регистрируемым параметром является изменение оптических свойств суспензии бактериальных клеток под воздействием переменного электромагнитного поля в широком диапазоне частот. А оптические свойства суспензии напрямую связаны с поляризационными свойствами клеток. Поэтому анализируемым результатом электрооптических измерений является частотная дисперсия анизотропии поляризуемости (ЧДАП).

Объектом изучения были бактерии *Escherichia coli* K12 С600, которые подвергались разрушающим воздействиям (спирт, тепло), повреждающим воздействиям (антибиотик грамицидин С, бактериофаг) и воздействиям, влияющим на жизнедеятельность микроорганизмов (наличие/отсутствие аэрации, разобщение окислительного фосфорилирования посредством 2,4-динитрофенола (ДНФ)).

Материалы и методы

В работе использовались бактерии *Escherichia coli* K12 С600 и бактериофаг EcV18 из музея ГНЦ ПМБ.

Культуру бактерий выращивали в жидкой среде – L-бульон (10 г триптона; 5 г дрожжевого экстракта; 5 г хлористого натрия; дистиллированная вода – до 1 л) или на поверхности твердой среды – L-агар (L-бульон с добавлением 15 г сухого агара на 1 л среды).

При культивировании в жидкой среде бактерии для исследований отбирали в середине логарифмической фазы роста. Воздействие теплом заключалось в помещении бактерий в кипящую водяную баню на 5 мин.

Воздействие спиртом заключалось в суспендировании отмытых от среды роста клеток в 70% спирте с последую-

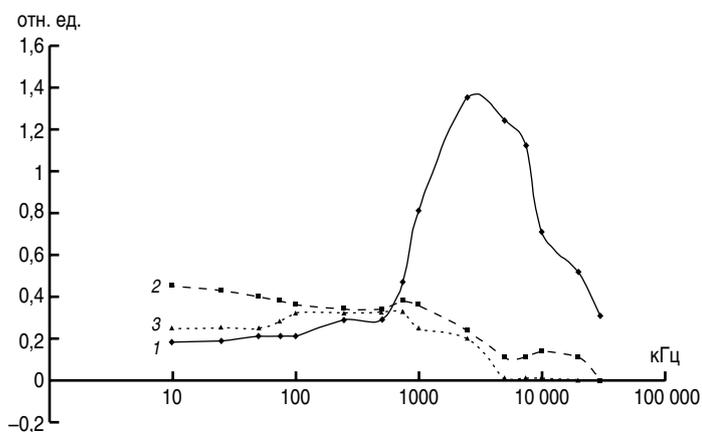


Рис. 1. Изменение ЧДАП суспензии клеток *E. coli* K12 С600 под воздействием тепла и спирта: 1 – интактные клетки; 2 – воздействие спирта; 3 – воздействие тепла.

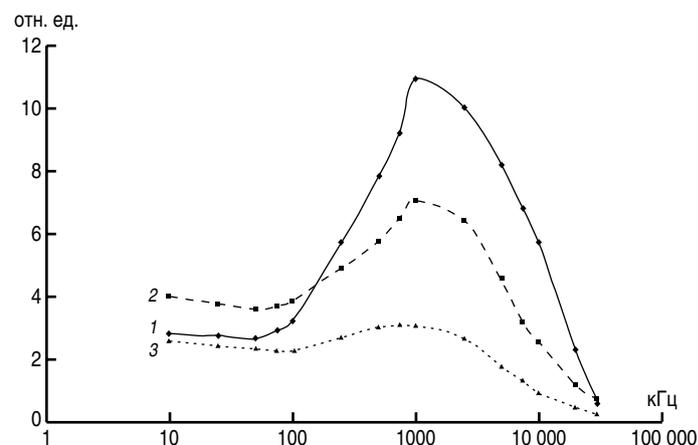


Рис. 2. Изменение ЧДАП суспензии клеток *E. coli* K12 С600 под воздействием грамицидина С: 1 – интактные клетки; 2 – воздействие грамицидина (5 мкг/мл); 3 – воздействие грамицидина (10 мкг/мл).

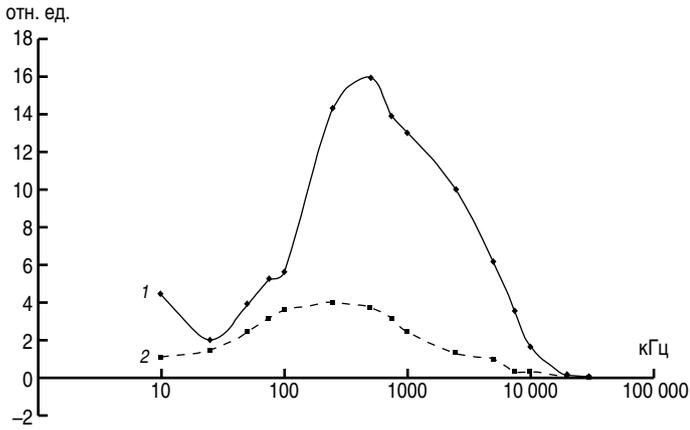


Рис. 3. Изменение ЧДАП суспензии клеток *E. coli* K12 S600 под воздействием бактериофага EсV18: 1 – интактные клетки; 2 – воздействие бактериофага.

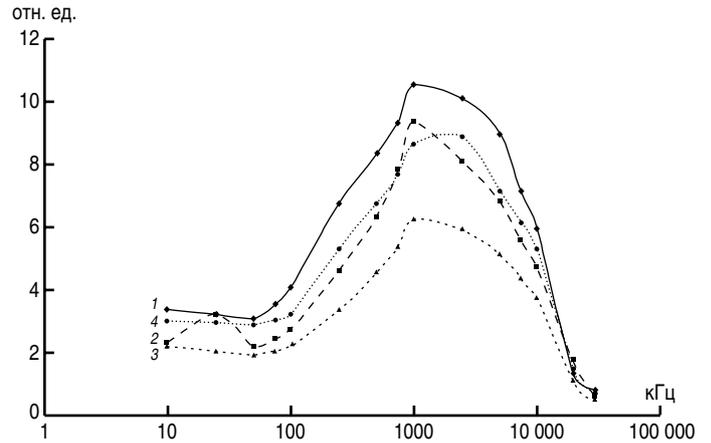


Рис. 4. Влияние аэрации на ЧДАП суспензии клеток *E. coli* K12 S600: 1 – исходная аэрация; 2 – через 20 мин после отключения аэрации; 3 – 50 мин после отключения аэрации; 4 – 35 мин после возобновления аэрации.

щей отмывкой и ресуспендированием в дистиллированной воде.

Антибиотик грамицидин С добавляли в среду культивирования за 15 мин до отбора пробы. Предварительно оттитрованный бактериофаг V18 добавляли в процессе культивирования за 30 мин до отбора пробы (соотношение фаг/клетка составляло ~20/1).

Наличие/отсутствие аэрации определялось находением колбы с культурой микроорганизмов на качалке при 37°C либо в термостате при той же температуре без встряхивания.

Воздействие 2,4-динитрофенола осуществлялось путем инкубации отмытых от среды роста клеток с этим веществом в течение 30 мин.

Контрольные и экспериментальные пробы отмывались от среды роста или инкубации на фильтре Millipor (диаметр пор – 0,45 мкм) в дистиллированной воде и в виде суспензии в этой воде с оптической плотностью 0,1 ($\lambda = 660$, $L = 10$ мм) использовались для электрооптических измерений.

Электрооптические измерения проводили с использованием установки ELBIC, разработанной в ГНЦ ПМБ. Это устройство позволяет регистрировать ЧДАП в диапазоне частот электрического поля от 10 кГц до 30 МГц, при напря-

женностях от 2 В/см до 15В/см и временах импульса от 1 сек до 120 сек. Источником света ($\lambda = 660$) является светодиод. В наших экспериментах использовался весь диапазон частот при напряженности поля 10 в/см и длительности импульса 2 с.

Результаты и обсуждение

Для определения возможных границ использования электрооптического анализа в микробиологии были получены ЧДАП нативных клеток *Escherichia coli* K12 S600 и клеток, подвергнутых разрушительному воздействию тепла и спирта. Разрушающее воздействие тепла и спирта (высевы показали снижение числа жизнеспособных клеток в обоих случаях на три порядка) приводит к исчезновению высокочастотного максимума на ЧДАП (рис. 1). Это указывает на то, что в основе бактерицидного действия и тепла, и спирта лежит нарушение целостности бактериальной мембраны.

Также нарушает целостность бактериальной мембраны и грамицидин С, являющийся протонофором [8]. Его воздействие приводит к заметному уменьшению высокочастотного максимума (рис. 2).

Воздействие большого количества бактериофагов на микробную клетку (соотношение фаг/клетка >10) вызывает так называемый «лизис извне» [9]. Естественно, при этом происходит нарушение целостности мембран, что закономерно отражается на ЧДАП бактериальной суспензии (рис. 3).

Бактерии *Escherichia coli* являются факультативными анаэробами. Поэтому кислород не является необходимым компонентом окружающей среды для их выживания. Однако его наличие или отсутствие радикально влияют на клеточный метаболизм и его энергетику (рис. 4).

Несколько неожиданным оказалось влияние разобщителя окислительного фосфорилирования 2,4-ДНФ на ЧДАП суспензии клеток *Escherichia coli* S600. Воздействие 2,4-ДНФ приводит не к снижению, как при всех прочих воздействиях, а к увеличению высокочастотного максимума (рис. 5). Объяснение этому следует искать в различных механизмах действия 2,4-ДНФ и грамицидина С: в отличие от последнего, создающего реальный канал в липидной мембране,

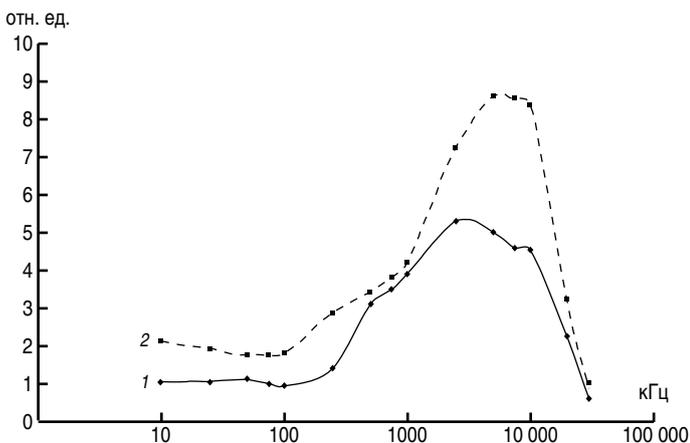


Рис. 5. Изменение ЧДАП суспензии клеток *E. coli* R12 S600 под воздействием 2,4-ДНФ: 1 – интактные клетки; 2 – воздействие 2,4-ДНФ.

2,4-ДФН является переносчиком протонов, встроенным в эту мембрану [10].

Таким образом, электрооптический анализ успешно регистрирует различные внешние воздействия на клетки микроорганизмов. При этом фиксируются как разрушительные и экстремально повреждающие воздействия, так и воздействия, лежащие в пределах физиологической нормы для данных микроорганизмов. Аналогичные или подобные воздействия испытывают клетки микроорганизмов в ходе биотехнологических процессов – культивирования, концентрирования, сушки и хранения. Ключевой структурой клеток, позволяющей электрооптике контролировать их состояние, является, по-видимому, бактериальная мембрана. Ее целостность и энергетический статус (трансмембранный потенциал, работа мембранных насосов и т.п.) очень чувствительны к внешним воздействиям. Одновременно эти параметры определяют наличие и величину высокочастотного максимума на ЧДАП, которая регистрируется с помощью электрооптического метода.

Литература

1. Игнатов СГ, Волошин АГ, Бунин ВД, Дятлов ИА. Электрооптический анализ в микробиологии. Серпухов: ФГУН ГНЦ ПМБ, 2007, 159 с.
2. Zhivkov A.M., Gyurova A.Y. High frequency electric polarizability of bacteria *E. coli*: dependence on the medium ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008 Oct 15;66(2):201-5. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.06.007
3. Швец НВ, Волошин АГ, Брезгунов ВН. Электрооптический метод оценки жизнеспособности микроорганизмов после сублимационной сушки. *Биотехнология*. 1987;3(4):528-31.
4. Лапыш МЕ, Игнатов СГ, Бунин ВД, Волошин АГ. Использование электрооптического метода для оперативного определения жизнеспособности бактериальных клеток. *Микробиология*. 1989;58(3):515-7.
5. Bunin VD, Voloshin AG, Bunina ZF, Shmelev VA. Electrophysical monitoring of cultivation process of recombinant *Esherichiae coli* strains. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996;51:720-724.
6. Bunin VD, Ignatov OV, Gulyi OI, Voloshin AG, Dykman LA, O'Neil D, Ivnitski D. Studies of *Listeria monocytogenes*-antibody binding using electro-orientation. *Biosens Bioelectron*. 2004 Jul 15;19(12):1759-61. DOI: 10.1016/j.bios.2003.12.027
7. Волошин АГ, Бунин ВД, Акимова ЛА, Игнатов СГ. Способ выделения и идентификации бактерий. Патент № 2431843.- 2011.
8. Овчинников ЮА. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987, 815 с.
9. Адамс М. Бактериофаги. М.: Иностранная литература, 1961, 527 с.
10. Jain A, Nishad KK, Bhose NB. Effects of DNP on the cell surface properties of marine bacteria and its implication for adhesion to surfaces. *Biofouling*. 2007; 23(3-4):171-7. DOI: 10.1080/08927010701269641

References

1. Ignatov SG, Voloshin AG, Bunin VD, Dyatlov IA. Elektroopticheskiy analiz v mikrobiologii [Electro-optical analysis in Microbiology]. Serpukhov: SRCAMB, 2007, 159 p. (In Russian).

2. Zhivkov A.M., Gyurova A.Y. High frequency electric polarizability of bacteria *E. coli*: dependence on the medium ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008 Oct 15;66(2):201-5. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.06.007
3. Shvets NV, Voloshin AG, Brezgunov VN. Elektroopticheskiy metod otsenki zhiznesposobnosti mikroorganizmov posle sublimatsionnoi sushki. *Biotehnologiya (Biotechnology)*. 1987;3(4):528-31. (In Russian).
4. Ignatov SG, Voloshin AG, Bunin VD. An electro-optic technique used for the prompt determination of viable bacterial cells. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 1989;58(3):515-7. (In Russian).
5. Bunin VD, Voloshin AG, Bunina ZF, Shmelev VA. Electrophysical monitoring of cultivation process of recombinant *Esherichiae coli* strains. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996;51:720-724.
6. Bunin VD, Ignatov OV, Gulyi OI, Voloshin AG, Dykman LA, O'Neil D, Ivnitski D. Studies of *Listeria monocytogenes*-antibody binding using electro-orientation. *Biosens Bioelectron*. 2004 Jul 15;19(12):1759-61. DOI: 10.1016/j.bios.2003.12.027
7. Voloshin AG, Bunin VD, Akimova LA, Ignatov SG. Method of isolation and identification of bacteria. Patent №2431843, 2011. (In Russian).
8. Ovchinnikov YuA. Bioorganicheskaya khimiya [Bioorganic chemistry]. Moscow: "Prosveshchenie" Publ., 1987, 815 p. (In Russian).
9. Adams M. Bakteriofagi [Bacteriophages]. Moscow: "Inostrannaya literatura" Publ., 1961, 527 p. (In Russian).
10. Jain A, Nishad KK, Bhose NB. Effects of DNP on the cell surface properties of marine bacteria and its implication for adhesion to surfaces. *Biofouling*. 2007; 23(3-4):171-7. DOI: 10.1080/08927010701269641

Информация об авторах:

Бунин Виктор Дмитриевич, доктор технических наук, Elosystems GbR
 Адрес: Henningsdorf, Germany
 E-mail: vikbun@inbox.ru

Веревкин Владимир Васильевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и гено-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0773

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, главный 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) 36-0773
 E-mail: ignatov@obolensk.org

Information about authors:

Viktor D. Bunin, Dr. Sci. (Tekh.), Elosystems GbR
 Address: Henningsdorf, Germany
 E-mail: vikbun@inbox.ru

Vladimir V. Verevkin, PhD (Biol.), Senior Researcher of Laboratory of Molecular Diagnostics and Genetically Engineered Preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0773

Sergey G. Ignatov, Dr. Sci. (Biol.), Chief Researcher of the Bionanotechnology Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0773
 E-mail: ignatov@obolensk.org

Микробиологическая оценка фторхинолонов II и III поколений для профилактики и лечения инфекционных осложнений хирургических операций

А.О.Зуева, В.И.Чувилкин, М.С.Подпорин, А.А.Лабазанов, А.М.Панин, В.Н.Царёв

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова», Москва, Российская Федерация

Исследовали влияние различных концентраций фторхинолонов на представителей анаэробной микробиоты. Для этой цели был выбран приоритетный патоген *Prevotella intermedia*. Антибактериальную активность фторхинолонов (ципрофлоксацин и левофлоксацин) оценивали в образцах крови через 1 и 3 ч культивирования в биореакторе. Установлено, что кривая роста на средах с добавленной сывороткой крови в присутствии цiproфлоксацина за 3 ч была примерно в 2 раза ниже, чем через 1 ч (OD 2,0–2,5), хотя полного торможения роста бактериальной популяции не наблюдалось. В случае применения левофлоксацина через 3 ч отмечено полное отсутствие роста бактерий (такое же, как через 1 ч), то есть имел место бактерицидный эффект.

Вывод. Результаты автоматического контроля роста бактериальной популяции в биореакторах показали, что левофлоксацин обладает бактерицидным эффектом после 1 и 3 ч культивирования. Цiproфлоксацин имел бактериостатический эффект в те же периоды времени наблюдения. Экспериментальные результаты подтверждают высокую бактерицидную активность и быстрое достижение минимальной подавляющей концентрации (МПК) левофлоксацина уже через 1 ч после введения.

Ключевые слова: фторхинолоны, автоматическое культивирование, биореактор, *Prevotella intermedia*

Для цитирования: Зуева А.О., Чувилкин В.И., Подпорин М.С., Лабазанов А.А., Панин А.М., Царёв В.Н. Микробиологическая оценка фторхинолонов II и III поколений для профилактики и лечения инфекционных осложнений хирургических операций. Бактериология. 2017; 2(4): 50–54. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-50-54

Microbiological evaluation of II and III generation quinolones in prevention and treatment of inflammatory complication in oral surgery

A.O.Zueva, V.I.Chuvilkin, M.S.Podporin, A.A.Labazanov, A.M.Panin, V.N.Tsarev

Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov, Moscow, Russian Federation

The effect of various concentrations of fluoroquinolones on representatives of anaerobic microbiota has been studied. Prioritized pathogen *Prevotella intermedia* was chosen for this purpose. Antibacterial activity of fluoroquinolones (ciprofloxacin and levofloxacin) was evaluated in blood samples after 1 and 3 hours of cultivation in a bioreactor. It was found that the growth curve on media with added serum in the presence of ciprofloxacin after 3 hours was approximately 2 times lower than after 1 hour cultivation (OD 2.0–2.5), although no complete inhibition of growth of the bacterial population was observed. In the presence of levofloxacin after 3 hours cultivation, there was a complete absence of bacterial growth (same as after 1 h), there was a bactericidal effect.

Conclusion. The results of automatic control of bacterial population growth in bioreactors showed that levofloxacin has a bactericidal effect after 1 and 3 hours of cultivation. Ciprofloxacin had a bacteriostatic effect at the same time of observation. The experimental results confirm the high bactericidal activity and the rapid achievement of the minimum inhibitory concentration (MIC) of levofloxacin already after 1 h after administration.

Keywords: fluoroquinolones, automatic cultivation, bioreactor, *Prevotella intermedia*

For citation: Zueva A.O., Chuvilkin V.I., Podporin M.S., Labazanov A.A., Panin A.M., Tsarev V.N. Microbiological evaluation of II and III generation quinolones in prevention and treatment of inflammatory complication in oral surgery. Bacteriology. 2017; 2(4): 50–54. (In Russian). DOI:10.20953/2500-1027-2017-4-50-54

Для корреспонденции:

Царёв Виктор Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова»

Адрес: 123425, Москва, ул. Деlegatesкая, 20/1
E-mail: nikola777@rambler.ru

Статья поступила 05.11.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Viktor N. Tsarev, MD, PhD, DSc, professor, director of Research Institute of Medicine and Dentistry, head of department by microbiology, virology and immunology of Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov

Address: 20/1, Delegateskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
E-mail: nikola777@rambler.ru

The article was received 05.11.2017, accepted for publication 22.12.2017

Для уменьшения риска развития инфекционных осложнений после хирургических операций в челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии используют различные методы, включая применение антибактериальных препаратов, антисептиков, физических воздействий (фотодинамическую терапию, лазер, ультразвук, медицинский озон и др.) [1–4]. В современной литературе данные об особенностях антибиотикотерапии и антибиотикопрфилактики у пациентов при проведении амбулаторных хирургических операций в стоматологии малочисленны и ограничены, как правило, использованием бета-лактамов препаратов [5–8].

Учитывая нередкие случаи аллергических реакций, явлений индивидуальной непереносимости препарата, развития дисбактериоза при использовании традиционных бета-лактамов препаратов, а также увеличение числа резистентных штаммов бактерий, актуальной задачей по-прежнему остается поиск новых эффективных антибактериальных средств для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных процессов при проведении хирургических вмешательств [1, 3, 8, 9].

С другой стороны, актуальным является изучение свойств отдельных представителей приоритетных патогенов с оценкой их чувствительности к антибактериальным препаратам. К патогенам – наиболее вероятным возбудителям инфекционно-воспалительных процессов в стоматологической практике относят целый ряд микроорганизмов, прежде всего, анаэробной группы: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* и ряд других видов. Большой интерес представляет вид *Prevotella intermedia*. Данный вид представлен неподвижными грамотрицательными облигатно анаэробными палочками. *Prevotella intermedia* обладает набором факторов вирулентности, таких как поверхностные адгезины, протеазы, гемолизины, липополисахариды клеточной мембраны. В экспериментах *in vitro* данный вид вызывает развитие абсцесса при подкожном введении взвеси бактерий экспериментальным животным, что свидетельствует о его очевидной патогенности [9]. Некоторые штаммы данного вида обладают способностью к инвазии эпителиоцитов и внутриклеточному паразитированию в них [6].

Данный вид считается истинным пародонтопатогеном, вызывая, наряду с другими пародонтопатогенными бактериями, поражение тканей пародонта и являясь этиологическим фактором развития пародонтита [3, 6, 9]. Обладая рядом факторов вирулентности, способен поражать ткани пародонта, наряду с другими бактериями. Данный микроорганизм часто обнаруживают при ряде одонтогенных инфекционно-воспалительных заболеваний, таких как инфекция тканей, окружающих имплантат, перикоронорит при ретенции 3-го моляра, флегмоны и абсцессы челюстно-лицевой области, медиастинит [6–8].

В связи с этим целью исследования были изучение чувствительности клинических изолятов *Prevotella intermedia* и других потенциальных возбудителей инфекционно-воспалительных осложнений к антибактериальным препаратам группы фторхинолонов *in vitro*, а также проведение сравнительной оценки активности антибактериальных препаратов группы фторхинолонов в сыворотке крови при ав-

томатизированном контроле роста бактериальной популяции приоритетного патогена *Prevotella intermedia* в реальном времени.

Материалы и методы

Первичный посев для выделения облигатных и факультативных анаэробов осуществляли на питательную среду M144 (Himedia, In.) с добавлением крови (для культивирования грамотрицательных анаэробных и грамположительных микроаэрофильных бактерий) и M1297A (Himedia, In.). Посевы помещали в термостат при 37°C на 48 ч (для анаэробных культур – в анаэроостат на 7 сут).

После получения и идентификации чистых культур в экспериментальной части использовали биореактор «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия). Данная система предназначена для культивирования микроорганизмов и оценки их роста в режиме реального времени. Интерпретацию результатов проводили по изменению оптической плотности OD при длине волны $\lambda = 850$ нм [4]. Для культивирования микроорганизмов в биореакторе использовались жидкие питательные среды производства HiMedia Laboratories Pvt. Limited (In.): Wilkins Chalgren Anaerobic Broth (M863) – для культивирования *Prevotella intermedia*. Для получения воспроизводимых результатов для биореактора использовали пробирки для анаэробов на 50 мл типа Falcon с крышкой без мембраны (BioSan, Латвия).

Для каждого эксперимента отдельно в стерильных пробирках типа Eppendorf готовили бактериальную взвесь в объеме 5 мл. Далее в каждую пробирку добавляли 18 мл питательной среды и вносили заранее подготовленную бактериальную взвесь в количестве 0,5 мл из заранее подготовленной пробирки, а затем сыворотку крови пациентов, принимавших левофлоксацин или ципрофлоксацин соответственно, – 1,5 мл. Общий объем в каждой пробирке довели до 20 мл. Соответственно концентрация взвеси до начала эксперимента составляла 10^2 КОЕ/мл, что соответствовало оптической плотности OD 0,2 McF.

Для культивирования *Prevotella intermedia* использовали следующий режим биореактора: Temperature: 37°C; RPM: 1200 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 1 sec; Volume: 20 ml λ : 850 nm.

Результаты и обсуждение

Для оценки активности антибактериальных препаратов группы фторхинолонов в сыворотке крови использовали биореактор при автоматизированном контроле роста бактериальной популяции приоритетного патогена *Prevotella intermedia* в реальном времени. Исследование динамики роста микроорганизмов проводили в четырех параллелях, что отражалось на графиках кривых роста бактериальных популяций контрольного образца. Оценка контроля роста исследуемого вида бактерий *Prevotella intermedia* отражалась в изменении параметров оптической плотности, на основании которых была построена кривая. Все основные фазы роста микроорганизмов (адаптивная, экспоненциального или логарифмического роста, стационарная), а также скорость прироста бактериальных популяций были индивиду-

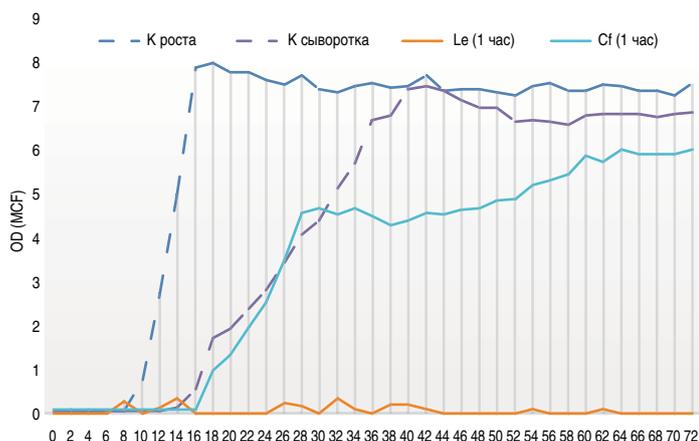


Рис. 1. Сравнительная характеристика кривых роста бактериальной популяции *Prevotella intermedia* при приеме ципрофлоксацина и левофлоксацина (через 1 ч после приема рекомендуемых доз).

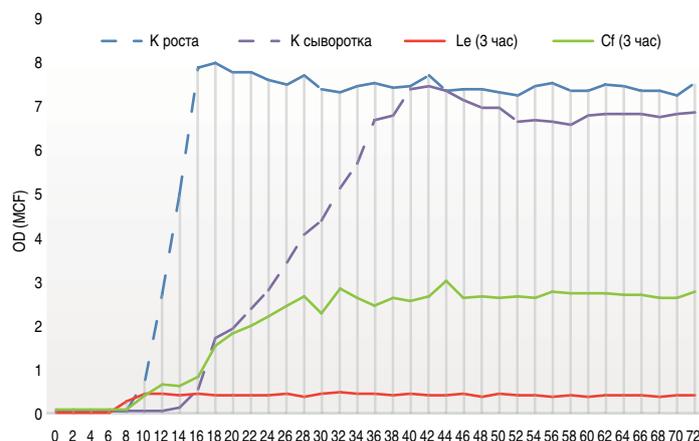


Рис. 2. Сравнительная характеристика кривых роста бактериальной популяции *Prevotella intermedia* при приеме ципрофлоксацина и левофлоксацина (через 3 ч после приема рекомендуемых доз).

дуальны и отражены для исследуемого штамма микроорганизма. Общее время культивирования для всех образцов составило 72 ч.

При оценке кривых роста бактериальных популяций клинического изолята *Prevotella intermedia* в зависимости от используемых антибактериальных препаратов и времени, прошедшего после однократного приема рекомендуемой дозы, получены следующие данные (рис. 1–3).

В пробе I (контроль) наблюдали типичный рост бактериальной популяции *Prevotella intermedia* (рис. 1). Начальная фаза, или фаза адаптации, составляла 8 ч, после чего ускоренный рост переходил в экспоненциальную фазу и кривая стремительно достигала максимума к 16-му часу, после чего наблюдалась длительная фаза стационарного роста на уровне 7,5 OD.

В пробе II (с добавлением донорской сыворотки) наблюдалось удлинение начальной фазы до 15 ч, после чего, с явным отставанием от контроля, численность бактериальной популяции постепенно нарастала, и фаза экспоненциального роста продолжалась до 40 ч, то есть скорость прироста бактериальной популяции под действием бактерицидных фак-

торов сыворотки снизилась. Однако стационарная фаза с максимумом биомассы бактериальной популяции далее находилась на том же уровне, что и в контроле (7,5–7,0 OD) вплоть до 72 ч культивирования.

В пробе III с добавлением сыворотки крови, взятой через 1 ч у пациента, принявшего ципрофлоксацин (500 мг), начальная фаза также была затяжной с крайне малым приростом бактериальной популяции, а фаза экспоненциального роста продолжалась до 28-го часа и достигала максимума 4,5 OD, что было достоверно ниже, чем в предыдущих пробах. Стационарная фаза также отличалась более низкой амплитудой с максимумом 5,0–6,0 OD, что указывает на бактериостатический эффект данной концентрации ципрофлоксацина (той, которая создавалась в сыворотке крови через 1 ч после приема препарата в дозе 200 мг), так как полной гибели бактериальной популяции не происходило.

В пробе IV с добавлением сыворотки крови, взятой через 1 ч у пациента, принявшего левофлоксацин (750 мг), начальная фаза и все последующие фазы кривой роста достоверно не отличались от нулевой линии, то есть рост бактери-

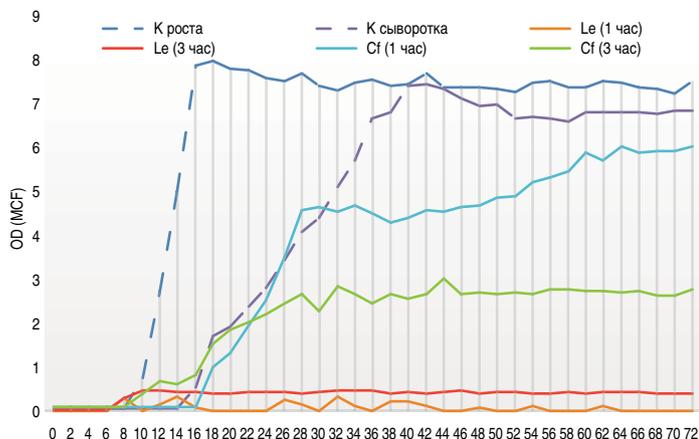


Рис. 3. Сравнительная характеристика кривых роста бактериальной популяции *Prevotella intermedia* при приеме ципрофлоксацина и левофлоксацина (через 1 и 3 ч после приема рекомендуемых доз).

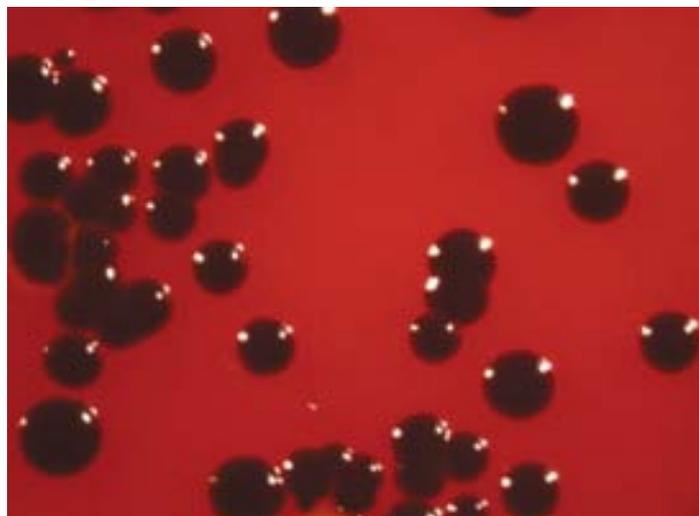


Рис. 4. Колонии *Prevotella intermedia*. 5% кровяной гемин-агар.

Таблица. Результаты количественного учета жизнеспособных клеток штамма *Prevotella intermedia* в разных пробах, взятых после культивирования в биореакторе (КОЕ/мл)

Время с момента приема до взятия сыворотки крови	контроль среды 10 ⁸ (±10 ²)	Пробы в биореакторе после приема препаратов		
		контроль сыворотки 10 ⁷ (±10 ²) P _{3/2} > 0,05	ципрофлоксацин 10 ⁶ (±10 ²) P _{4/2} < 0,05	левофлоксацин 0
1 ч	–	–	10 ⁶ (±10 ²) P _{4/2} < 0,05	0
3 ч	–	–	10 ³ (±10 ²) P _{4/2} < 0,05	0

альной популяции отсутствовал на протяжении всего периода наблюдения – 72 ч.

Следовательно, через 1 ч после приема левофлоксацина в дозе 750 мг в сыворотке создавалась концентрация, обеспечивающая бактерицидный эффект.

На рис. 2 отображены кривые роста контрольных проб (пробирки I и II), которые соответствуют описанным выше, и кривые роста, полученные при добавлении сыворотки, взятой через 3 ч у пациентов после приема исследуемых химиопрепаратов (пробирки V и VI).

Очевидно, что амплитуда кривой роста при использовании ципрофлоксацина через 3 ч была примерно в 2 раза ниже, чем при использовании через 1 ч (OD 2,0–2,5), хотя полной гибели бактериальной популяции не наблюдалось. То есть ципрофлоксацин и в этом случае давал бактериостатический эффект.

Что касается пробы с левофлоксацином через 3 ч, то, как и в предыдущей пробе (через 1 ч), мы наблюдали отсутствие роста бактериальной популяции – бактерицидный эффект.

На рис. 3 отчетливо видны различия антибактериальной активности сравниваемых химиопрепаратов, которые подтверждают высокую бактерицидную активность и быстрое накопление МПК левофлоксацина уже через 1 ч после приема пациентом.

При высевах из проб в биореакторе на 5% кровяной гемин-агар с последующим культивированием в анаэробной среде с бескислородной газовой смесью (80% азота, 10% углекислого газа, 10% водорода) для выявления жизнеспособных бактерий *Prevotella intermedia* получен типичный рост колоний данного вида – пигментированные, выпуклые, блестящие, округлые, 0,5–2 мм в диаметре, S-формы (рис. 4). Содержание бактерий в посевах питательной среды в контроле составило 10⁸ (±10²) КОЕ/мл, при добавлении сыворотки крови несколько ниже – 10⁷ (±10²) КОЕ/мл, однако различия по критерию Манна-Уитни были не достоверны.

При использовании сыворотки крови, взятой у добровольцев через 1 ч после однократного приема ципрофлоксацина (таблетированная форма 400 мг), наблюдали достоверное снижение количества бактерий по сравнению с контролем – 10⁶ (±10²) КОЕ/мл. При использовании сыворотки крови, взятой у тех же добровольцев через 3 ч после однократного приема препарата, наблюдали дальнейшее снижение количества колоний по сравнению с контролем – 10³ (±10²) КОЕ/мл. В случае выполнения аналогичного исследования с образцами, в которые добавляли сыворотку крови, взятую у добровольцев через 1 и 3 ч после приема левофлоксацина (таблетированная форма 750 мг), ни

в одном случае роста колоний возбудителя не было выявлено (таблица).

Заключение

Результаты изучения чувствительности клинического изолята облигатно-анаэробных бактерий *Prevotella intermedia* свидетельствуют, что препарат левофлоксацин эффективно подавляет рост бактериальных видов потенциальных возбудителей инфекционно-воспалительных процессов, возникающих в клинике хирургической стоматологии. При проведении автоматизированного контроля роста бактериальной популяции в реальном времени с добавлением сыворотки крови пациентов-добровольцев после приема антибактериальных препаратов группы фторхинолонов установлены достоверные различия антибактериальной активности препаратов фторхинолонового ряда в отношении приоритетного патогена – *Prevotella intermedia*; левофлоксацин оказывал бактерицидное действие через 1 ч и 3 ч после перорального приема, ципрофлоксацин – только бактериостатическое, которое было более выражено через 3 ч после приема препарата. Данное обстоятельство позволяет обосновать использование препарата левофлоксацин в дозировке 750 мг не только в терапии инфекционно-воспалительных процессов полости рта, но при назначении за 1 ч до оперативного вмешательства в качестве антибактериальной профилактики.

Литература

- Ипполитов ЕВ, Царев ВН. Хинолоны и фторхинолоны. В кн.: Под ред. Ющука НД, Балмасовой ИП, Царева ВН. Антибиотики и противоинфекционный иммунитет. М.: Практическая медицина, 2012, с. 208-221.
- Лепилин АВ, Райгородский ЮМ, Григорьева ДА, Ерокина НЛ, Касьян ИА, Абрашитова ФБ. Сравнительное исследование бактерицидных свойств лазерного и светодиодного излучения фиолетовой области (405 нм) спектра на бактерии полости рта. Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2016;15(4):202-6.
- Панин АМ, Царев ВН, Чувилкин ВИ, Зуева АО. Профилактика воспалительных осложнений при костнопластических операциях. Российский вестник челюстно-лицевой хирургии. 2013;1(27):50-3.
- Царёв ВН, Подпорин МС, Ипполитов ЕВ. Оценка эффективности эндодонтической дезинфекции корневых каналов зуба с применением сканирующей электронной микроскопии микробной биопленки. Бактериология. 2017;1(2):6-13.
- Chuvilkina E, Zueva A, Chuvilkin V, Panin A, Tsarev V. Do fluoroquinolones prevent sinusitis in maxillary antroplasty for implant surgery? International Dental Journal. 2017;1(67):20-1.
- Brian R. Dorn, K.-P. Leung, and Ann Progulsk-Fox* Editor: J. R. McGhee. Invasion of Human Oral Epithelial Cells by *Prevotella intermedia*. Infection and immunity. 1998; 66(12): 6054-7.
- Hupp JR, Ferneini EM. Head, neck, and orofacial infections. An interdisciplinary approach. Netherlands: Elsevier; 2016: 482 p.
- Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000;90(5):600-8. DOI: 10.1067/moe.2000.109639
- Chow AW, Roser SM, Brady FA. Orofacial odontogenic infections. Ann Intern Med. 1978 Mar;88(3):392-402.

References

1. Ippolitov EV, Tsarev VN. Khinolony i ftorkhinolony. In: Editet by Yushchuk ND, Balmasovoy IP, Tsareva VN. Antibiotics and anti-infectious immunity. Moscow: "Practical medicine" Publ., 2012, pp. 208-221. (In Russian).
2. Lepilin AV, Raigorodsky YuM, Grigor'eva DA, Erokina NL, Kas'yan IA, Abdrashitova AS. The comparative study of the bactericidal properties of laser and photodiode radiation in the violet region of the spectrum (405 nm) on the bacteria of the mouth cavity. *Fizioterapiya, Bal'neologiya i Reabilitatsiya*. 2016;15(4):202-6. (In Russian).
3. Panin AM, Tsarev VN, Chuvilkin VI, Zueva AO. Prevention of inflammatory complications in osteoplastic operations. *Russian Herald of Dental Implantology*. 2013;1(27):50-3. (In Russian).
4. Tsarev VN, Podporin MS, Ippolitov EV. Evaluating the effectiveness of endodontic disinfection root channels by using scanning electron microscopy of microbial biofilms. *Bacteriology*. 2017;1(2):6-13. (In Russian).
5. Chuvilkina E, Zueva A, Chuvilkin V, Panin A, Tsarev V. Do fluoroquinolones prevent sinusitis in maxillary antroplasty for implant surgery? *International Dental Journal*. 2017;1(67):20-1.
6. Brian R. Dorn, K.-P. Leung, and Ann Progulsk-Fox* Editor: J. R. McGhee. Invasion of Human Oral Epithelial Cells by *Prevotella intermedia*. *Infection and immunity*. 1998; 66(12): 6054-7.
7. Hupp JR, Ferneini EM. Head, neck, and orofacial infections. An interdisciplinary approach. Netherlands: Elsevier; 2016: 482 p.
8. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000;90(5):600-8. DOI: 10.1067/moe.2000.109639
9. Chow AW, Roser SM, Brady FA. Orofacial odontogenic infections. *Ann Intern Med*. 1978 Mar;88(3):392-402.

Информация об авторах:

Зуева Анна Олеговна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры хирургической стоматологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
 Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
 E-mail: zuevazueva2012@mail.ru

Чувилкин Владимир Иванович, доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургической стоматологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
 Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
 E-mail: microbiology@mail.ru

Подпорин Михаил Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
 Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
 E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Панин Андрей Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой хирургической стоматологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
 Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
 E-mail: andreypanin@yandex.ru

Information about co-authors:

Anna O. Zueva, MD, PhD, assistant professor, department of oral surgery, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov
 Address: 20/1 Delegatskaya Str., Moscow, 123425, Russian Federation
 E-mail: zuevazueva2012@mail.ru

Vladimir I. Chuvilkin, MD, PhD, DSc, professor, department of oral surgery, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov
 Address: 20/1 Delegatskaya Str., Moscow, 123425, Russian Federation
 E-mail: microbiology@mail.ru

Mikhail S. Podporin, junior reserch associate, laboratory of Molecular biology investigation, Research Institute of Medicine and Dentistry of Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov
 Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation
 E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Andrey M. Panin, MD, PhD, DSc, professor, head of department of oral surgery, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov
 Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation
 E-mail: andreypanin@yandex.ru

Анализ микробиологического разнообразия криосферы на примере мерзлых грунтов Мамонтовой горы

Г.М.Единин¹, А.В.Брушков¹, Е.А.Денисенко², В.В.Веревкин², С.Н.Вирысов², С.Г.Игнатов²

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова», Москва, Российская Федерация;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Московская область, Российская Федерация

В статье описаны микробиологические подходы при анализе мерзлых грунтов района Мамонтовой горы в республике Саха, Якутия. Подробно описано выделение бактерий и бактериофагов из проб вечномёрзлых грунтов. Представлены результаты выделения микроорганизмов из исследуемых пород.

Ключевые слова: мерзлые грунты, Мамонтова гора, бактерии, бактериофаги

Для цитирования: Единин Г.М., Брушков А.В., Денисенко Е.А., Веревкин В.В., Вирысов С.Н., Игнатов С.Г. Анализ микробиологического разнообразия криосферы на примере мерзлых грунтов Мамонтовой горы. Бактериология. 2017; 2(4): 55–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-55-59

Analysis of microbial diversity in the cryosphere with permafrost samples from Mount Mammoth area as an example

G.M.Edinin¹, A.V.Brushkov¹, E.A.Denisenko², V.V.Verevkin², S.N.Viryasov², S.G.Ignatov²

¹Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The paper deals with microbiological approaches applied in analyzing permafrost samples from the Mount Mammoth area in the Republic of Sakha, Yakutia. The process of isolation of bacteria and bacteriophages from the samples is described in detail. There is data on isolating microorganisms from analyzable geological formations.

Keywords: permafrost, Mount Mammoth, bacteria, bacteriophages

For citation: Edinin G.M., Brushkov A.V., Denisenko E.A., Verevkin V.V., Viryasov S.N., Ignatov S.G. Analysis of microbial diversity in the cryosphere with permafrost samples from Mount Mammoth area as an example. Bacteriology. 2017; 2(4): 55–59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-55-59

В последнее время, наряду с понятиями литосферы, гидросферы и атмосферы, вводится понятие криосферы – как сфера с низкими температурами, где вода находится в основном в виде льда [1]. В настоящее время криосфера представляет собой 1/5 поверхности планеты Земля, учитывая сезонные вариации и довольно длительный тренд уменьшения своей поверхности [2]. Парадигма криосферы от «безжизненных континентов» [3] сдвигается в сторону специфических экосистем [4] и идеального места для возникновения жизни [1]. Считается, что лед как особая форма воды присутствовал во Вселенной гораздо раньше воды и останется в ней

навсегда. Благодаря своим физико-химическим свойствам лед является хорошей защитой биологического объекта от физических облучений, химических контаминаций и биологических инвазий. Поэтому криосфера Земли считается основным хранилищем биологического разнообразия [5].

Район Мамонтовой горы является уникальным участком выхода вечной мерзлоты на поверхность Земли с летними температурами до + 16°C.

Целью работы являлись выделение микроорганизмов и бактериофагов из мерзлых толщ Мамонтовой горы (Якутия) и их характеристика.

Для корреспонденции:

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией нанобиотехнологии 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) 36-07-73
E-mail: ignatov@obolensk.org

Статья поступила 23.11.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Sergey G. Ignatov, DSc in Biology, head of the bionanotechnology laboratory, 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) 360773
E-mail: ignatov@obolensk.org

The article was received 23.11.2017, accepted for publication 22.12.2017

Краткое описание объекта исследований

Объект изучения – образцы мерзлых грунтов, полученные из Мамонтовой горы. Мамонтова гора (Республика Саха, Якутия) приурочена к левому берегу реки Алдан, в его нижнем течении, и представляет собой один из наиболее интересных и полных разрезов неоген-плейстоценового времени осадконакопления Восточной Сибири.

Климат района резко континентальный и суровый, с холодной зимой, теплым летом, очень малым количеством осадков и высокой годовой амплитудой температур.

Геологические характеристики Мамонтовой горы

Район Мамонтовой горы представляет собой левобережный участок долины р. Алдана, примыкающий непосредственно к руслу реки. Рельеф верхнего уровня Мамонтовой горы – самый древний в данном районе. Однако значительные изменения его происходили и происходят в настоящее время за счет деятельности современных тектонических, эрозионных и в особенности мерзлотных процессов.

Оттаивание вечномерзлых грунтов в обрыве террасы создает чрезвычайно благоприятные условия для массового сползания и оплывания рыхлого материала и быстрого (1–1,5 м в год) отступления склона. Местами можно наблюдать целые гребни (серии блоков пород) длиной 50–70 м, переместившиеся вниз по склону на 5–6 м. Верхняя часть склона, сложенная лессовидными суглинками, образует почти отвесные обрывы (склон отседания). Ниже тянутся оползневые склоны. Таким образом, склоны этой террасы в целом очень подвижны. Перемещение по ним больших масс рыхлого материала создает большие трудности для вскрытия ненарушенных слоев и отбора в них образцов.

Среднегодовые температуры на поверхности пород в пределах описываемой территории изменяются от –4 до –6°C.

Методика отбора образцов, исследования их свойств и выделения микроорганизмов

Для исследования были отобраны образцы песка в районе отложения Мамонтовой горы.

В полевых условиях из многолетнемерзлых толщ с помощью стерилизованных спиртом и обожженных в пламени инструментов отбирались образцы мерзлых пород ненарушенной структуры весом 4–6 кг, преимущественно песчаного состава с редкими прослоями мелкодисперсных грунтов и включениями органических остатков. Пробы мерзлых пород на микробиологические исследования отбирались в зонах максимальной интенсивности речной эрозии из свежесброшенных вертикальных стенок обнажения в средней и нижней его части в интервалах 5–10 м выше уреза реки и 20–30 м ниже уровня земной поверхности. Скорость термоэрозионного разрушения обнажения в местах отбора, по данным выполняемых режимных наблюдений, превышает 4–5 м в год в верхней части и достигает 1–1,5 м в средней. Отбор производился с глубин, превышающих мощность сезонноталого слоя на 1–1,5 м, что исключало попадание в зону отбора ранее оттаивавших пород. Отобранные монолиты хранились в мерзлом состоянии при температуре, близкой к естественной (–5°C). Транспортировка проб в лабораторию также осуществлялась без их оттаивания в термомониторингах с хладагентами.

Визуальное обследование отобранных образцов показало, что они представлены слоистыми тонкодисперсными отложениями с чередованием более светлых слоев алевролита толщиной от 0,5–1 мм с более темными и мощными (3–5 мм) слоями близкого гранулометрического состава.

В специально оборудованной лаборатории были определены физические свойства песка и проведено выделение микроорганизмов. Полученные образцы изучались с помощью оптического микроскопа.

В лабораторных стерильных условиях из центра образца извлекали пробу размером приблизительно 3 × 4 см, помещали в спирт на 2–3 с, после чего обжигали в пламени спиртовки. Обработанный таким образом материал переносили в пустую колбу со стерильной питательной средой и культивировали при 37°C в течение суток. Далее образцы высевали на твердую питательную среду для выделения бактерий или проводили специальные микробиологические исследования для выделения фагов.

Анализ микроорганизмов из мерзлых грунтов

В образцах древних отложений Мамонтовой горы обнаружена культивируемая бактерия, способная к аэробному и анаэробному росту. Микроорганизм является психротолерантным, т.к. способен к метаболической активности при –5°C. Бактерии представляли собой сравнительно большие (1–1,5 × 3–6 микрон) палочки, которые образовывали цепи при культивировании и были способны образовывать споры круглой формы. Данные грамположительные бактерии были неподвижны и обладали гемолитической активностью. Полученные микроорганизмы принадлежат роду *Bacillus*. Наибольшее видовое подобие выделенной бациллы отмечено с *Bacillus cereus* и *B. pumilus*.

Известно, что основной мишенью воздействия низких температур является цитоплазматическая мембрана. Данные нарушения репарируются и приводят к выживанию бактерий при длительном культивировании [1].

Можно предположить, что бактерии, сохранившие жизнеспособность в многолетнемерзлых породах, находятся там в покоящихся формах, а для перехода в вегетативное состояние им требуется около 3 сут пребывания при положительных температурах.

Поиск бактериофагов, обладающих литической активностью в отношении культуры микроорганизмов, выделенных из образца мерзлотного грунта

Бактериофаги (фаги) являются вирусными паразитами фагов. Это самые мелкие формы жизни, которые находятся в активном состоянии только внутри бактериальных клеток. В последнее время фаги привлекают внимание как инструменты борьбы с патогенными микроорганизмами, организованными в устойчивые к лекарственным препаратам биопленки [6].

Для выделения бактериофагов использовали четыре подхода.

1. Ночную культуру, выращенную на чашке со средой NA (Nutrientagar производства HiMedia Laboratories) петлей внесли в качалочную колбу с 200 мл бульонной среды LB (Luria Bertani Broth, Miller производства HiMedia Laboratories).

Колбу помещали на качалку на 1 ч при температуре 37°C. К подращенной культуре добавляли небольшое количество грунта, 100 мкл образца канализационных стоков, а также петлей внесли культуры *Bacillus subtilis* 168, *B. thuringiensis* 1373, *B. cereus* 504, *B. megaterium* 1435. Далее колбу снова помещали на качалку на 4 часа при температуре 37°C, а затем в термостат при температуре 37°C на сутки. На следующий день в колбу добавляли 20 мл хлороформа, помещали на качалку при комнатной температуре на 30 мин. После этого содержимое колбы центрифугировали в режиме 10 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Аккуратно отбирали надосадочную жидкость и перенесли в стерильную колбу.

2. Ночную культуру, выращенную на чашке со средой NA (Nutrientagar производства HiMedia Laboratories) петлей внесли в качалочную колбу с 300 мл бульонной среды LB (Luria Bertani Broth, Miller производства HiMedia Laboratories). Колбу помещали на качалку на 2 ч при температуре 37°C. Далее подращенную культуру разливали в неглубокие стерильные емкости и подвергали воздействию ультрафиолетового облучения от лампы в ламинарном шкафу в течение 1 мин. Затем культуру переносили в качалочную колбу и поместили на качалку на 4 ч при температуре 37°C, а затем в термостат при температуре 37°C на сутки. На следующий день в колбу добавляли 30 мл хлороформа и помещали на качалку при комнатной температуре на 30 мин. После этого содержимое колбы центрифугировали в режиме 10 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Аккуратно отбирали надосадочную жидкость и переносили в стерильную колбу.

Далее обе пробы центрифугировали на ультрацентрифуге «OPTIMA L-100XP» в режиме 26 000 об/мин в течение 2 ч при комнатной температуре. Аккуратно удалили надосадочную жидкость из центрифужных стаканов и высушили на фильтровальной бумаге. Далее к осадкам от пробы 1 добавляли по 3 мл фагового буфера SM (в шести центрифужных стаканах), а к осадкам пробы 2 – по 1 мл (в шести центрифужных стаканах). Затем стаканы хранили в холодильнике в течение суток. На следующий день осадки в стаканах аккуратно ресуспендировали и перенесли в две стерильные полипропиленовые пробирки, получив таким образом концентрированные препараты, обозначенные «препарат 1» и «препарат 2» соответственно.

Препарат 1 для дополнительной очистки центрифугировали в режиме 10 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Аккуратно отобрали надосадочную жидкость и перенесли в стерильную полипропиленовую пробирку, обозначив ее как «препарат 1».

Проверили наличие литической активности в препаратах методом спот-тест

На чашку со средой наслоили 4,5 мл полужидкого агара на основе бульона LB (0,6 г агарозы на 100 мл бульона), смешанного с 0,5 мл суспензии исследуемой культуры. После того, как верхний агар застыл, на него наносили каплей по 10 мкл препарат 1 и препарат 2, дождалась полного впитывания препаратов в верхний слой агара и поместили чашку в термостат на 24 ч при температуре 37°C. На следующий день проанализировали результат теста: газон культуры на чашке получился сплошной ровный, в местах нанесения капель препарата 1 и препарата 2 не наблюдалось разрыва культурального газо-

на, что свидетельствует об отсутствии литической активности этих препаратов по отношению к культуре.

3. Индукция бактериофага с помощью различных доз ультрафиолета.

В ночь до начала эксперимента культуру, выделенную из мерзлотной породы, с чашечной среды ГРМ посеяли петлей в пробирку с 5 мл бульонной среды LB, оставили на ночь в термостате при 37°C.

На следующий день приготовили чашки с двуслойным агаром и газоном суточной культуры. Для этого в стерильную пробирку внесли 0,5 мл суточной культуры, добавили 4,5 мл полужидкого агара на основе бульонной среды LB (0,6 г агарозы на 100 мл LB), хорошо перемешали и наслоили на поверхность чашечной среды ГРМ. Таким образом приготовили 5 чашек. Далее чашки инкубировали в термостате при 37°C в течение 2 ч. Чашки подвергли облучению с помощью ультрафиолетового облучателя с мощностью – 4кВт по следующей схеме.

- 1) Опыт 1 – 5 мин.
- 2) Опыт 2 – 10 мин.
- 3) Опыт 3 – 15 мин.
- 4) Опыт 4 – 20 мин.
- 5) Контроль – 30 мин при комнатной температуре без облучения.

Чашки инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч. Для обнаружения литической активности осуществляли поиск характерных бляшек на газоне исследуемой культуры.

4. Культивирование при пониженной температуре.

В ночь до начала эксперимента культуру, выделенную из мерзлотной породы, с чашечной среды ГРМ посеяли петлей в пробирку с 5 мл бульонной среды LB, оставили на ночь в термостате при 37°C. На следующий день полученную суточную бульонную культуру перенесли в колбу со свежеприготовленной бульонной средой LB в объеме 250 мл. Колбу поместили в термостат при температуре 20°C.

Продолжительность инкубации – 2 нед. Каждый день производили визуальный контроль мутности и размешивание культуральной взвеси вручную.

В конце каждой недели осуществляли отбор образца культуральной взвеси объемом 0,5 мл. В образец добавляли 50 мкл хлороформа, выдерживали в термостате при 37°C в течение часа. Далее образец центрифугировали в режиме 10 000 об/мин при комнатной температуре в течение 10 мин. Отбирали надосадочную жидкость и проверяли наличие литической активности с помощью спот-теста на газоне культуры, выделенной из мерзлотной породы.

К сожалению, в ходе этих разнообразных и длительных экспериментов нам не удалось выделить бактериофаг, лизирующий культуру, выделенную из мерзлотных пород.

Поиск бактериофагов, обладающих литической активностью в отношении других микроорганизмов

На примере клеток *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* была предпринята попытка выделения бактериофагов, обладающих литической активностью в отношении других микроорганизмов.

Наличие бактериофагов в препаратах определяли методом спот-теста (нанесение капли препарата на газон бакте-

риальной культуры). При наличии стерильного пятна лизиса на газоне бактериальной культуры его собирали в 1 мл SM буфера, добавляли 20 мкл хлороформа и использовали для дальнейшего анализа методом двухслойного агара. Наличие бляшек (негативных колоний) в верхнем слое агара указывало на фаговую природу лизиса.

Если таким способом обнаружить фаг не удавалось, использовали метод обогащения. Для этого смесь равных объемов стерильного супернатанта и 2-кратного LB бульона инфицировали суспензией бактерий одного вида и инкубировали в течение ночи при 37°C при 100 об/мин. Наличие бактериофагов в препарате искали по схеме, описанной выше.

Обсуждение и выводы

При анализе мерзлотных грунтов района Мамонтовой горы в республике Саха, Якутия, были выделены микроорганизмы, принадлежащие роду *Bacillus*. Выявленные биологические свойства бактерий, наряду с самим фактом сохранения ими жизнеспособности на протяжении значительного промежутка времени, позволяют говорить о необходимости более детального их изучения и перспективности использования выделенных штаммов в биотехнологиях. Полученные недавно результаты показывают, что микроорганизмы, выделенные из вечномерзлых грунтов, обладают протективным действием для мышей, предохраняя их от патогенных бактерий [7]. Вопрос выделения и идентификации микроорганизмов из различных сред обитания актуален не только с точки зрения физиолого-биохимических свойств древних бактерий, но и возможности обнаружения патогенов. В настоящее время существуют разнообразные подходы к выделению и идентификации микроорганизмов [8–11]. Наряду с известными иммунологическими подходами [12], разрабатываются бесконтактные методы на основе анализа газовой компоненты продуктов жизнедеятельности микроорганизмов [13]. Современные достижения в области физики и химии успешно применяются для идентификации микроорганизмов [14–18]. Понимание тонких механизмов взаимодействия древних бактерий и их фрагментов и иммунной системы позволит разработать новую стратегию эффективной терапии хронических инфекций. Предварительные результаты показали возможность такой терапии [7].

Известно, что недавно были выделены вирусы из мерзлотных пород [19]. Попытки выделения бактериофага, специфического к микроорганизму *Bacillus F*, не увенчались успехом. Более того, не удалось обнаружить других бактериофагов, обладающих литической активностью. По-видимому, это связано с тем, что микроорганизмы с интеркалированным геномом бактериофагов элиминировались в ходе длительного хранения (около 100 млн лет) в криосфере в результате спорадического аутолизиса бактерий.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Литература

1. Мельников ВП, Рогов ВВ, Курчатова АН, Брушков АВ, Грива ГИ. Распределение микроорганизмов в мерзлых грунтах. Криосфера Земли. 2011;XV(4):86-90.

2. Boetius A, Anesio AM, Deming JW, Mikucki JA, Rapp JZ. Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. Nat Rev Microbiol. 2015 Nov;13(11):677-90. DOI: 10.1038/nrmicro3522.
3. Byrd RE. Alone: the classic polar adventure. Washington, DC: Island Press/Shearwater Books, 2003, 314 p.
4. Hodson A, et al. Glacial ecosystems. Ecological Monographs. 2008;78(1):41-67.
5. Мельников ВП, Геннадик ВБ, Брушков АВ. Аспекты криософии: криоразнообразия в природе. Криосфера Земли. 2013;XVII(2):3-11.
6. Игнатов СГ, Волошин АГ, Федюкина ГН, Ганина ЕА, Мочалов ВВ, Денисенко ЕА, Перовская ОН. Бактериальные биопленки и фаги. Инфекция и иммунитет. Спец. выпуск. 2014, с. 82-3.
7. Fursova O, Potapov V, Brouchkov A, Pogorelko G, Griva G, Fursova N, Ignatov S. Probiotic activity of a bacterial strain isolated from ancient permafrost against salmonella infection in mice. Probiotics Antimicrob Proteins. 2012 Sep;4(3):145-53. DOI: 10.1007/s12602-012-9105-z.
8. Волошин АГ, Бунин ВД, Акимова ЛА, Игнатов СГ. Патент РФ №2431834 (2011) Способ выделения и идентификации бактерий.
9. Игнатов СГ, Волошин АГ, Бунин ВД, Дятлов ИА. Электрооптический анализ в микробиологии. Монография. Оболенск: ГУП МО «Серпуховская типография», 2007.
10. Лапыш МЕ, Светогоров ДЕ, Игнатов СГ. Определение анизотропии поляризуемости бактериальных клеток при средней степени ориентации. Коллоидный журнал. 1991;53(2):365-7.
11. Тюрин ЕА, Дятлов ИА, Игнатов СГ. Современные методы определения патогенных микроорганизмов. Нанотехнологии и охрана здоровья. 2012;4(10):34-41.
12. Иващенко ТА, Белова ЕВ, Дентовская СВ, Белькова СА, Балахонов СВ, Игнатов СГ, Шемякин ИГ. Разработка и испытание иммуноферментной моноклональной тест-системы для выявления в антигена *Yersinia pestis*. Прикладная биохимия и микробиология. 2014;50(2):211-8. DOI: 10.7868/S055510991402010X
13. Волошин АГ, Филиппович СЮ, Бачурина ГП, Бесаева СГ, Игнатов СГ. Спектрометрический анализ летучих компонентов микроорганизмов. Прикладная биохимия и микробиология. 2010;46(3):331-5.
14. Дубровин ЕВ, Краевский СВ, Игнатьев ТЕ, Федюкина ГН, Игнатов СГ. Патент РФ №2437937 (2011) Способ определения наличия бактерий *Escherichia coli detection* по детектированию их фрагментов с помощью атомно-силовой микроскопии.
15. Игнатов СГ, Виравсов СН, Федюкина ГН. Применение АСМ для специфической визуализации микроорганизмов. В кн.: Молекулярная диагностика – 2007. Под редакцией В.И.Покровского. М., 2007, с. 81-82.
16. Уткин ДВ, Германчук ВГ, Спицын АН, Ерохин ПС, Кузнецов ОС, Куклев ВЕ, и др. Биосенсорные технологии в диагностике инфекционных болезней. Монография. Под ред. Кутырева ВВ. Тверь: Триада, 2014, 111 с.
17. Dubrovina EV, Yaminsky IV, Fedyukina GN, Ignatov SG, Kraevsky SV, Ignatyuk TE. AFM specific identification of bacterial cell fragments on biofunctional surfaces. Open Microbiol J. 2012;6:22-8. DOI: 10.2174/1874285801206010022.
18. Ignatyuk TE, Ivanova OE, Ereemeeva TP, Fedjukina GN, Voloshin AG, Akimova LA, et al. Immobilization of viruses using langmuir antibody films based on amphiphilic polyelectrolytes for atomic force microscopy. In: Advances in single molecule research for biology and nanoscience. Proceedings of the IX. Linz Winter Workshop 2007. Linz: Trauner, 2008, p. 86-90.
19. Legendre M, Bartoli J, Shmakova L, Jeudy S, Labadie K, Adrait A, et al. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Mar 18;111(11):4274-9. DOI: 10.1073/pnas.1320670111

References

1. Mel'nikov VP, Rogov VV, Kurchatova AN, Brushkov AV, Griva GI. Raspredelenie mikroorganizmov v merzlykh gruntakh. Kriosfera Zemli. 2011;XV(4):86-90. (In Russian).

2. Boetius A, Anesio AM, Deming JW, Mikucki JA, Rapp JZ. Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. *Nat Rev Microbiol.* 2015 Nov;13(11): 677-90. DOI: 10.1038/nrmicro3522.
3. Byrd RE. *Alone: the classic polar adventure.* Washington, DC: Island Press/Shearwater Books, 2003, 314 p.
4. Hodson A, et al. Glacial ecosystems. *Ecological Monographs.* 2008;78(1):41-67. (In Russian).
5. Mel'nikov VP, Gennadinik VB, Brushkov AV. Aspekty kriosofii: krioraznoobrazie v prirode. *Kriosfera Zemli.* 2013;XVII(2):3-11. (In Russian).
6. Ignatov SG, Voloshin AG, Fedyukina GN, Ganina EA, Mochalov VV, Denisenko EA, Perovskaya ON. Bakterial'nye bioplenki i fagi. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2014;S:82-3. (In Russian).
7. Fursova O, Potapov V, Brouchkov A, Pogorelko G, Griva G, Fursova N, Ignatov S. Probiotic activity of a bacterial strain isolated from ancient permafrost against salmonella infection in mice. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2012 Sep;4(3): 145-53. DOI: 10.1007/s12602-012-9105-z.
8. Voloshin AG, Bunin VD, Akimova LA, Ignatov SG. Patent RUS №2431834 (2011) Method of isolation and identification of bacteria. (In Russian).
9. Ignatov SG, Voloshin AG, Bunin VD, Dyatlov IA. Elektroopticheskii analiz v mikrobiologii [Electro-optical analysis in microbiology]. *Obolensk: «Serpukhovskaya tipografiya» Publ., 2007.* (In Russian).
10. Lapysh ME, Svetogorov DE, Ignatov SG. Determination of the anisotropy of polarizable bacterial cells at the medium orientation degree. *Colloid Journal.* 1991;53(2):365-7. (In Russian).
11. Tyurin EA, Dyatlov IA, Ignatov SG. Sovremennyye metody opredeleniya patogennykh mikroorganizmov. *Nanotekhnologii i okhrana zdorov'ya.* 2012;4(10):34-41. (In Russian).
12. Ivaschenko TA, Belova EV, Dentovskaya SV, Ignatov SG, Shemyakin IG, Belkova SA, Balakhonov SV. Development and testing of an enzyme immunoassay-based monoclonal test system for the detection of the *Yersinia pestis* V antigen. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2014;50(2):187-93. DOI: 10.7868/S055510991402010X (In Russian).
13. Voloshin AG, Besaeva SG, Ignatov SG, Filippovich SY, Bachurina GP. Spectrophotometric analysis of volatile compounds in microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2010;46(3):303-6. (In Russian).
14. Dubrovin EV, Kraevskii SV, Ignatyuk TE, Fedyukina GN, Ignatov SG. Patent RUS №2437937 (2011) Method for determining the presence of *Escherichia coli* detection bacteria by detecting their fragments using atomic force microscopy. (In Russian).
15. Ignatov SG, Viryasov SN, Fedyukina GN. Primenenie ASM dlya spetsificheskoi vizualizatsii mikroorganizmov. In: *Molecular diagnosis – 2007.* Edited by V.I. Pokrovskogo. Moscow, 2007, pp. 81-82. (In Russian).
16. Utkin DV, Germanchuk VG, Spitsyn AN, Erokhin PS, Kuznetsov OS, Kuklev VE, et al. Biosensornyye tekhnologii v diagnostike infektsionnykh boleznei [Biosensor technology in diagnostics of infectious diseases]. Edited by Kutyreva VV. *Tver': "Triada" Publ., 2014, 111 p.* (In Russian).
17. Dubrovin EV, Yaminsky IV, Fedyukina GN, Ignatov SG, Kraevskiy SV, Ignatyuk TE. AFM specific identification of bacterial cell fragments on biofunctional surfaces. *Open Microbiol J.* 2012;6:22-8. DOI: 10.2174/1874285801206010022.
18. Ignatyuk TE, Ivanova OE, Ereemeeva TP, Fedjukina GN, Voloshin AG, Akimova LA, et al. Immobilization of viruses using langmuir antibody films based on amphiphilic polyelectrolytes for atomic force microscopy. In: *Advances in single molecule research for biology and nanoscience. Proceedings of the IX. Linz Winter Workshop 2007.* Linz: Trauner, 2008, p. 86-90.
19. Legendre M, Bartoli J, Shmakova L, Jeudy S, Labadie K, Adrait A, et al. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Mar 18;111(11): 4274-9. DOI: 10.1073/pnas.1320670111

Информация об авторах:

Единин Григорий Михайлович, аспирант кафедры геокриологии геологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»
 Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы
 Телефон: (495) 939-1728
 E-mail: edidin.grigory@gmail.com

Брушков Анатолий Викторович, доктор геолого-минералогических наук, профессор, заведующий кафедрой геокриологии геологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»
 Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы
 Телефон: (495) 939-1728
 E-mail: brouchkov@geol.msu.ru

Денисенко Егор Алексеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
 Адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховской р-н, п. Оболенск
 Телефон: (4967) 36-0147
 E-mail: EgorD1988@gmail.com

Веревкин Владимир Васильевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск
 Телефон: (4967) 36-0147
 E-mail: lab-mdgip@mail.ru

Вирьясов Сергей Николаевич, кандидат физико-математических наук, заведующий отделом биофизики ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
 Адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховской р-н, п. Оболенск
 Телефон: (4967) 36-0773
 E-mail: viryasov@obolensk.org

Information about authors:

Grigory M. Edinin, postgraduate student, of the department of geocryology, faculty of geology, Lomonosov Moscow State University
 Address: Faculty of Geology, Russia, 119991, Moscow, GSP-1, 1 Leninskiye Gory
 Phone: (495) 939-1728
 E-mail: edidin.grigory@gmail.com

Anatoliy V. Brushkov, Dr. Sci. (Geol), professor, head of the department of geocryology, faculty of geology, Lomonosov Moscow State University
 Address: Faculty of Geology, Russia, 119991, Moscow, GSP-1, 1 Leninskiye Gory
 Phone: (495) 939-1728
 E-mail: brouchkov@geol.msu.ru

Yegor A. Denisenko, researcher of the laboratory of molecular diagnostics and genetically engineered preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967)36-0147
 E-mail: EgorD1988@gmail.com

Vladimir V. Verevkin, PhD (Biol), senior researcher of the laboratory of molecular diagnostics and genetically engineered preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0147
 E-mail: lab-mdgip@mail.ru

Sergey N. Viryasov, PhD (Phys.-Math.), head of the department of biophysics, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0773
 E-mail: viryasov@obolensk.org

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

Москва, 16–17 ноября 2017 г.

Эффективность применения молекулярно-биологических методов исследования при вспышках норовирусной инфекции в г. Ярославле

Аверкиева Т.В.¹, Кузьмина Г.В.², Саляхутдинова Н.В.²,
Барановская Т.Н.², Деменчук М.Ю.²

¹Управление Роспотребнадзора по Ярославской области,
Ярославль;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской
области», Ярославль

Проведена оценка эффективности применения методов ПЦР-диагностики в расшифровке вспышек острых кишечных инфекций, имевших место в Ярославле в 2015–2017 гг.

Материалом для исследования служили фекалии от больных и контактных в очагах острых кишечных инфекций с целью установления этиологии заболевания, выявления источника инфекции. Исследования были проведены методом ПЦР с использованием тест-системы «Ампли-Сенс-Rotavirus (группаА)/Norovirus (геногруппаII)/Astrovirus-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Амплификатор – «Rotor-Gene 6000».

С 2011 по 2016 гг. на базе бактериологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской области» были проведено 9650 исследований на рота-, норо- и астровирусную инфекции с выделением РНК вирусов – 435 исследований, из них 341 исследование (78%) – с определением норовирусов (геногруппа II). В декабре 2016 г. наше внимание привлекла вспышка в СОШ №1. В лабораторию были доставлены фекалии от 62 человек. Ввиду недостатка диагностикумов, чтобы расшифровать вспышку биоматериал (43 образца) был направлен в референс-центр по мониторингу за ОКИ ФБУН ЦНИИ эпидемиологии (г. Москва), где в 34 образцах (81%) была выявлена РНК норовирусов I геногруппы. Проведено генотипи-

рование норовирусов. Результат типирования: NoV геногруппа I, генотип-4. Результаты субвидового типирования норовирусов позволили расценить случаи заболевания как потенциально связанные между собой. Тест-система для ПЦР, применяемая в практике, предусматривает определение норовирусов только второй геногруппы.

В марте 2017 г. в МОУ СОШ №33 произошла еще одна крупная вспышка острого гастроэнтерита. Исследован биоматериал (фекалии) от 41 человека. У 22 человек выявлена РНК *Norovirus* II геногруппы. Образцы клинического материала были направлены в референс-центр, где было подтверждено присутствие РНК *Norovirus* II геногруппы и проведено генотипирование норовирусов. Результат типирования: NoV геногруппа II, генотип-16. Эти исследования подтверждают данные международной сети надзора за норовирусами *NoroNet* о том, что в зимний сезон 2016–2017 гг. на территории Германии, Австралии, Финляндии, Нидерландов, Франции, России, Китая и Японии отмечены случаи выявления рекомбинантного генотипа норовирусов NoV GII.P16. По данным из Германии и Японии, данный генотип NoV GII.P16 к февралю 2017 г. практически вытеснил доминировавший ранее эпидемический генотип NoV GII.P17. Зарегистрированная вспышка норовирусной инфекции в МОУ СОШ №33 г. Ярославля подтверждает высокий эпидемический потенциал рекомбинантного варианта норовируса NoV GII.P16.

Выводы.

1. Метод полимеразной цепной реакции является эффективным методом диагностики острых гастроэнтеритов.

2. Основными этиологическими агентами при вспышках острого гастроэнтерита в Ярославле за анализируемый период являются норовирусы. Ведущая роль принадлежит норовирусам второй геногруппы. Внутри геногруппы II норовирусы различных генотипов могут циркулировать одновременно или вытеснять друг друга, вызывая как спорадическую, так и вспышечную заболеваемость.

3. Для обеспечения проведения эффективной этиологической диагностики диарейных заболеваний необходимо внедрение в практику новых тест-систем для выявления норовирусов первой геногруппы.

Современные аспекты организации деятельности бактериологических лабораторий Роспотребнадзора на территориальном уровне

Молдованов В.В.¹, Кобышева Е.В.¹, Подкорытов Ю.И.²

¹Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» в Юго-Восточном административном округе города Москвы;

²Управление Роспотребнадзора по железнодорожному транспорту, Москва

Результаты бактериологического лабораторного контроля являются одним из ведущих элементов в разработке программ деятельности по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения и санитарно-эпидемиологического надзора. При составлении планов лабораторных исследований необходимо осуществлять углубленный анализ санитарно-эпидемиологического состояния объектов с учетом специфики функционирования учреждений, подлежащих обследованию. Объемы и частота лабораторных анализов должны обеспечивать получение статистически достоверных данных о состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия объектов надзора. При организации бактериологических исследований важным моментом является организация обеспечения качества проб, доставляемых в лабораторию. Методы и время отбора проб для исследования зачастую остаются вне контроля лаборатории, однако быстрое начало исследования образца в лаборатории даст возможность достижения наиболее достоверного результата. По имеющимся данным (Шепелин А.П., Домотенко Л.В., 2015), использование специальных транспортных сред позволяет обеспечить сохранение жизнеспособности микроорганизмов в течение 48–72 ч, без резкого изменения концентрации микроорганизмов в пробах, что крайне важно при исследовании материала из объектов окружающей среды на отдаленных территориях обслуживания. При организации лабораторных исследований важным моментом является также определение чувствительности бактериальных культур к антибиотикам и другим антимикробным средствам, особенно обнаруженных в пробах атмосферного воздуха из детских дошкольных учреждений.

В микробиологической лаборатории филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» в ЮАО г. Москвы работа ежегодно проводится в соответствии с годовыми, полугодовыми, квартальными планами. В лаборатории ежегодно проводится около 80 тысяч бактериологических исследований. Уделяется серьезное внимание вопросам повышения готовности лаборатории и специалистов к выполнению качественных исследований, в соответствии с действующими нормативными документами. С целью проведения внутреннего контроля качества работ ежегодно проводятся исследования зашифрованных образцов (по санитарной бактериологии, паразитологии и другим видам воз-

будителей, в том числе и по холере), подготовленных в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве». Все зашифрованные задачи были решены правильно. Поддержание готовности лаборатории и специалистов к качественному выполнению анализов остается актуальной задачей.

Проблемы диагностики особо опасных инфекций в муниципальных бактериологических лабораториях

Подкорытов Ю.И.

Управление Роспотребнадзора по железнодорожному транспорту, Москва

Заболеваемость особо опасными инфекциями среди населения Российской Федерации находится чаще на спорадическом уровне. Однако как с позиций санитарной охраны территории, так и профилактики заболеваний вопросы лабораторной диагностики особо опасных инфекций на территориальном уровне остаются актуальными. Известно, что в отдельных регионах Российской Федерации неоднократно наблюдался завоз больных холерой различными видами транспорта. В связи с этим от готовности территориальных бактериологических лабораторий к проведению первичной лабораторной диагностики холеры (как материала от больных, так и из объектов окружающей среды) во многом зависит своевременность начала проведения противоэпидемических мероприятий по предупреждению распространения холеры. Качество проведения исследований на холеру во многом определяется пригодностью питательных сред, которые должны быть под контролем лабораторий особо опасных инфекций, а также укомплектованностью лабораторий диагностическими холерными сыворотками (О1-, Инаба-, Огава- и О139-). При этом, следует учитывать, что в пробах из водных источников нередко выявляются холерные вибрионы серологических вариантов, отличных от О1-группы, Окончательный анализ исследований на холеру и идентификация выделенных культур должны осуществляться в специализированных лабораториях противочумных учреждений, курирующих конкретные регионы.

От готовности территориальных бактериологических лабораторий к принятию мер по организации диагностики других особо опасных инфекций также зависит своевременность осуществления лабораторного анализа, локализации и ликвидации очагов заболевания. В связи с этим, в лабораториях желательно иметь адреса и телефоны референс-центров по диагностике особо опасных инфекций.

В территориальных бактериологических лабораториях в некоторых случаях приходится проводить серологические исследования на особо опасные инфекции. Характерен случай заражения 42-летнего охотника туляремией на Дальнем Востоке, когда соболь укусил охотника за палец. После появления симптомов туляремии при лабораторном исследовании сыворотки крови у него были выявлены антитела к туляремийному микробу в титре 1:640.

Таким образом, вопросы готовности территориальных бактериологических лабораторий по диагностике некоторых особо опасных инфекций остаются актуальной задачей.

РЕЗОЛЮЦИЯ

XI Всероссийского съезда Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» (Москва, 16–17 ноября 2017 г.)

Период между X и XI съездами Общероссийской общественной организации «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» (далее по тексту – Общество) характеризовался ростом осознания мировым сообществом необходимости объединения усилий в борьбе с известными и вновь возникающими инфекционными болезнями, которые в условиях интенсификации региональных и глобальных интеграционных процессов, либерализации торговли, усиления внутренней и внешней миграции представляют реальную угрозу для здоровья населения, глобального развития и благосостояния человечества. Риски возникновения и трансграничного распространения опасных патогенов усугубляют региональные конфликты и международный терроризм.

Изменения социально-экономической ситуации в России находят отражение в состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Возрастающее давление на человека неблагоприятных факторов окружающей природной среды, усиление техногенного воздействия на здоровье населения как проявления социально-экологического кризиса требуют принципиально новых, научно обоснованных подходов к организации управления эпидемиологической ситуацией с использованием технологий, направленных на снижение эпидемиологического риска.

К важнейшим особенностям глобальной эпидемиологической ситуации, оказавшим существенное влияние на стратегию и тактику борьбы с инфекционными болезнями в отчетный период, можно отнести:

- крупнейшую в истории вспышку лихорадки Эбола;
- эпидемию лихорадки Зика;
- обострение эпидемиологической ситуации по холере, чуме, сибирской язве;
- повышение заболеваемости вакциноуправляемыми инфекциями (корью, гепатитом А, полиомиелитом, желтой лихорадкой);
- стремительно формирующуюся лекарственную устойчивость микроорганизмов;
- появление новых реассортантных высокопатогенных штаммов вируса гриппа и коронавируса;

- существенные изменения в эпидемиологии ВИЧ-инфекции – ее феминизацию, изменение возрастной структуры заболевших, повышение роли полового пути передачи вируса;

- рост заболеваемости острыми кишечными инфекциями вирусной этиологии.

В Российской Федерации борьба с инфекционными и паразитарными заболеваниями является важнейшим стратегическим направлением по выполнению государственной задачи сохранения здоровья нации, снижения уровня смертности, увеличения продолжительности жизни людей и преодоления негативных демографических тенденций.

Эффективное планирование и последовательная реализация комплекса санитарно-противоэпидемических и профилактических мероприятий в отношении инфекционных заболеваний позволили обеспечить в целом по Российской Федерации стабильную эпидемиологическую ситуацию. Достигнуто и сохраняется в течение ряда лет эпидемиологическое благополучие по инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики, в том числе по полиомиелиту, кори, коклюшу, дифтерии и столбняку; удалось добиться значительного снижения заболеваемости краснухой и вирусным гепатитом В. Зарегистрировано снижение заболеваемости брюшным тифом, бактериальной дизентерией (шигеллезом), острым гепатитом С, менингококковой инфекцией, геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС), клещевым вирусным энцефалитом (КВЭ), иксодовыми клещевыми боррелиозами (ИКБ), гранулоцитарным анаплазмозом человека (ГАЧ), сифилисом, гонококковой инфекцией, впервые выявленным туберкулезом и псевдотуберкулезом.

Продолжалась работа по совершенствованию Национального календаря профилактических прививок, расширены группы риска, подлежащие вакцинации против гриппа, ревакцинации против кори. Осуществлен переход с трехвалентной на бивалентную живую полиомиелитную вакцину, зарегистрирована моновалентная 2-го типа живая вакцина против полиомиелита, ведется разработка отечественной инактивированной полиовакцины. В ряде регионов успешно

реализуются региональные календари профилактических прививок с внедрением плановой вакцинации детей против ветряной оспы, ротавирусной инфекции, ревакцинации против коклюша.

За последние годы достигнуто значительное расширение международного сотрудничества в сфере противодействия инфекционным болезням. Возросла роль Российской Федерации в решении международных гуманитарных проблем здравоохранения, борьбе с инфекционными болезнями, обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

В отчетном периоде продолжалась реализация инициатив в области борьбы с инфекционными и паразитарными болезнями, одобренных решениями СНГ, ШОС, АТЭС, Евразийского экономического союза.

Основная работа в отчетном периоде была направлена на реализацию Указов Президента Российской Федерации и основополагающих документов Правительства Российской Федерации, федеральных и региональных программ в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, в том числе мероприятий по поддержанию статуса Российской Федерации как страны, свободной от полиомиелита, программы «Элиминация кори и краснухи в Российской Федерации», мероприятий, направленных на борьбу с гриппом, осуществления комплекса профилактических мероприятий в целях снижения интенсивности распространения ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов.

Члены Общества активно участвуют в образовательной деятельности среди населения, способствуя росту приверженности населения вакцинопрофилактике и снижению влияния антивакцинальных информационных кампаний, понимания необходимости и важности профилактики инфекций и инвазий. Для достижения этой цели широко используются все средства массовой информации и коммуникации, включая Интернет-ресурсы.

Региональные отделения Общества в проводимой работе тесно взаимодействуют с территориальными органами и учреждениями Роспотребнадзора. Специалисты Общества постоянно развивают сотрудничество с представителями родственных научно-практических обществ, особенно активно ведется совместная работа с Национальным обществом инфекционистов.

Восстановлены и развиваются научные связи со странами СНГ и Балтии. Общество сотрудничает с Международным союзом микробиологических обществ, Федерацией европейских микробиологов, Всемирной организацией здравоохранения. Осуществляется Программа содействия Социалистической Республике Вьетнам в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, активно работает Российско-Гвинейский Центр эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней. Членами Общества накоплен и обобщен опыт обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в период проведения массовых мероприятий с международным участием.

Под эгидой Общества активно работают научные профессиональные журналы: «Журнал эпидемиологии, микробиологии и иммунологии», «Медицинская паразитология и паразитарные болезни», «Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы», «Эпидемиология и вакцино-

профилактика», «Вакцинация» и «Дезинфекционное дело». Ряд региональных отделений издает научные труды, сборники тезисов, информационные материалы.

Члены Общества на федеральном и региональном уровнях принимали активное участие в проведении фундаментальных и прикладных исследований в области эпидемиологии, микробиологии и паразитологии, подготовке нормативных документов, что способствовало повышению эффективности осуществления санитарно-эпидемиологического надзора и иммунопрофилактики и паразитарных болезней.

Вместе с тем, в отчетном периоде Президиум, Правление и региональные отделения уделяли недостаточное внимание проблемам биобезопасности. В ходе работы Съезда было обращено особое внимание на недостаточное привлечение к деятельности Общества молодых специалистов научных и практических учреждений. Необходимо расширение международного сотрудничества Общества с научными и общественными организациями как в рамках международных программ и проектов, так и отдельных направлений научных исследований и конкретных практических задач.

Съезд постановил:

1. Признать работу Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов в 2013–2017 гг. удовлетворительной.
2. Утвердить отчет ревизионной комиссии.
3. Утвердить новую редакцию Устава.
4. Избрать председателем Правления Общества д.м.н., академика РАН В.Г.Акимкина.

Съезд призвал членов Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов сосредоточить усилия на реализации следующих приоритетных направлений в области эпидемиологического надзора и профилактики инфекционных болезней:

- осуществление мероприятий по поддержанию статуса страны, свободной от полиомиелита, и оптимизации эпидемиологического надзора и лабораторного контроля за циркуляцией энтеровирусов в рамках реализации программы «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции»; предотвращение рисков возврата инфекции на заключительном этапе ликвидации полиомиелита с учетом опыта выделения вакцинородственного вируса полиомиелита типа 2 в России в 2016 г. и осуществления ответных мер по противодействию его распространению;

- выполнение мероприятий Национального плана в рамках программы «Элиминация кори и краснухи в Российской Федерации (2016–2020 гг.)», в том числе организация дополнительных профилактических и противоэпидемических мероприятий в целях дальнейшего снижения заболеваемости корью и краснухой в Российской Федерации, осуществление верификации элиминации кори и краснухи с учетом прогресса на пути ликвидации заболеваний в Европейском регионе ВОЗ;

- совершенствование эпидемиологического надзора за гриппом, ОРВИ и внебольничными пневмониями, оптимизация сигнального надзора за острыми респираторными заболеваниями в Российской Федерации, мониторинга за гриппом птиц и изучение высокопатогенных вирусов гриппа;

- контроль за реализацией Национального календаря профилактических прививок (обеспечение не менее 95% охвата населения), обращая особое внимание на иммунизацию групп риска, изучение и внедрение опыта применения новых вакцин отечественного и зарубежного производства в рамках региональных программ вакцинации детского населения, совершенствование тактики активной иммунизации взрослых;

- изыскание возможности привлечения для финансирования региональных календарей/региональных программ, помимо бюджетов субъектов РФ, внебюджетных средств (страховые, благотворительные фонды, средства предприятий и учреждений, личные средства граждан), а также средств ФОМС, ФДС, пенсионного фонда, бюджетов муниципальных образований;

- совершенствование системы профилактики ВИЧ-инфекции, продвижение на пути элиминации вертикальной передачи ВИЧ, организация контрольно-надзорных мероприятий в части снижения рисков инфицирования ВИЧ при оказании медицинской помощи, изучение распространения ВИЧ-инфекции в России с определением территориальной специфики циркулирующих ВИЧ и учетом генетического разнообразия вирусов;

- выполнение мероприятий по оптимизации эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП), их регистрации и учету, широкое внедрение перспективных направлений дезинфектологической профилактики ИСМП на основе оценки чувствительности к дезсредствам госпитальных штаммов микроорганизмов;

- разработка новых подходов к стратегии и тактике специфической и неспецифической профилактики паразитарных болезней;

- разработка новых перспективных антимикробных препаратов, осуществление мониторинга устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам на основе комплексного подхода и региональных особенностей;

- выполнение комплекса профилактических и противозoonозных мероприятий по предупреждению распространения природно-очаговых и зооантропонозных болезней, оптимизация противозoonозных мероприятий, методов неспецифической профилактики природно-очаговых болезней, картирование стационарных зон риска, а также зон повышенного риска заражения (сибирская язва, бешенство, «клещевые», «комариные» и другие природно-очаговые инфекции) с точной географической привязкой и учетом факторов неблагополучия;

- оптимизация принципов и системы мероприятий по обеспечению санитарной охраны территорий (Российская Федерация, Таможенный Союз, СНГ, ЕврАзЭС) на основе эпидемиологического надзора, профилактики и борьбы с актуальными инфекционными болезнями, внедрения ГИСТехнологий в современное информационно-аналитическое и прогнозно-моделирующее направления их реализации;

- дальнейшее развитие действующей на территории Российской Федерации системы центров мониторинга возбудителей инфекционных и паразитарных болезней, функционирующих в рамках Международных медико-санитарных правил, путем создания Центров, сотрудничающих с ВОЗ в

области методического и практического обеспечения мероприятий по предупреждению, верификации и ответных мер на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения, имеющих международное значение;

- активизация работы по созданию Консультативного комитета по иммунизации для возможности регулярного обновления Национального календаря профилактических прививок и Календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям (является расходным обязательством бюджетов субъектов Российской Федерации) в условиях меняющейся эпидемиологической обстановки и регистрации в РФ новых актуальных вакцин;

- совершенствование системных подходов в области предупреждения и оперативного реагирования на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера на основе инновационных разработок и модернизации методологической, материально-технологической базы учреждений, обеспечивающих биобезопасность страны;

- дальнейшее развитие нормативной и методической базы осуществления санитарно-эпидемиологического надзора и профилактики инфекционных и паразитарных болезней на основе повсеместного использования новых информационных телекоммуникационных технологий и диагностических систем;

- совершенствование противозoonозной работы органов и учреждений Роспотребнадзора при взаимодействии с заинтересованными федеральными и региональными органами исполнительной власти;

- разработка и реализация региональных программ в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения по актуальным для субъекта Российской Федерации инфекционным и паразитарным болезням с учетом социально-демографических и экономических условий;

- обоснование и содействие включению основных противопаразитарных лекарств в перечень жизненно важных и необходимых лекарственных средств;

- совершенствование деятельности трехуровневой лабораторной сети, включая создание новых и оптимизацию работы существующих референс- и региональных центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней, улучшение материально-технической базы лабораторий и повсеместное внедрение современных методов исследований;

- развитие системы внешнего контроля качества лабораторных исследований для подразделений лабораторной службы Роспотребнадзора и ее гармонизация с другими отечественными и международными системами внешней оценки качества;

- развитие и внедрение методов генотипирования для обеспечения эпидемиологических исследований и определения лекарственной устойчивости микроорганизмов;

- обеспечение широкого использования бактериофагов в профилактике инфекционных болезней, в т.ч. инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи;

- совершенствование организации эпидемиологически безопасной системы обращения с медицинскими отходами и внедрение в практику современных методов и аппаратуры их обеззараживания;

- обеспечение подготовки высококвалифицированных кадров по эпидемиологии, диагностике и профилактике инфекционных и паразитарных болезней, активное привлечение молодых специалистов к научной и практической деятельности;

- совершенствование научной деятельности молодых ученых и студентов медико-профилактического профиля.

Съезд рекомендовал членам Общества интенсифицировать фундаментальные и прикладные исследования в области эпидемиологии, диагностики и профилактики инфекционных и паразитарных болезней по следующим направлениям:

- изучение эпидемиологических особенностей инфекционных, паразитарных и неинфекционных болезней на современном этапе и факторов, определяющих тенденции развития эпидемического процесса;

- совершенствование Национального календаря профилактических прививок на основе всестороннего изучения иммунологической и эпидемиологической эффективности применения новых вакцинных препаратов;

- паспортизация и эпидемиологическое районирование административных территорий Российской Федерации по внешним и внутренним рискам в области биологической безопасности;

- создание вакцин нового поколения, в том числе живых рекомбинантных вакцин на базе вирусных векторов, производимых с использованием методов генной инженерии, комбинированных вакцин, живых поливалентных противовирусных вакцин, ДНК-вакцин;

- изучение особенностей генома возбудителей инфекционных болезней, связанных с их вирулентностью и патогенностью с целью создания новых методов профилактики и лечения инфекционных и паразитарных болезней;

- развитие биотехнологий и нанотехнологий (биочипов, биосенсоров и др.) для создания и масштабного производства диагностических и лекарственных препаратов и внедрения методов молекулярного анализа в практику санитарно-эпидемиологического надзора;

- разработка алгоритмов лабораторной диагностики возбудителей инфекционных болезней на основе широкого внедрения молекулярно-биологических методов в формате мультиплексного анализа, метода MALDI-TOF, планарных суспензионных и тканевых микрочипов;

- совершенствование научных и методических основ биобезопасности, системы противэпидемических мероприятий при чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера;

- разработка новых информационных технологий, программного и математического обеспечения эпидемиологи-

ческого надзора за наиболее актуальными инфекционными, паразитарными и неинфекционными болезнями;

- анализ эпидемиологической и социальной значимости паразитарных болезней и микозов в современных условиях, разработка и выпуск отечественных тест-систем для диагностики микозов;

- разработка стратегии и тактики применения методов и средств неспецифической профилактики инфекционных болезней на основе мониторинга устойчивости микроорганизмов, насекомых и грызунов к дезинфекционным средствам;

- совершенствование научных и методических основ применения бактериофагов с целью профилактики инфекционных болезней.

Съезд поручил Президиуму и Правлению Общества:

- активизировать связь с региональными отделениями, расширить участие членов Президиума и Правления в работе на местах, привлекать ведущих ученых и организаторов здравоохранения к участию в мероприятиях Общества;

- шире использовать современные информационные технологии для постоянного обмена информацией между Президиумом, региональными отделениями и членами Общества;

- совместно с региональными отделениями вести работу по разъяснению через средства массовой информации эффективности и важности предупреждения инфекционных и паразитарных болезней;

- активно информировать население через СМИ и научные издания о важности и безопасности иммунопрофилактики инфекционных болезней;

- в целях повышения уровня охвата и своевременности иммунизации населения в декретированных возрастах в рамках Национального Календаря профилактических прививок обратиться в Минздрав с предложением разработки и внедрения в РФ системы электронного учета прививок;

- выступать с инициативами по подготовке предложений по борьбе с инфекционными и паразитарными болезнями, угрозой биотерроризма, по повышению биобезопасности;

- участвовать в подготовке и оценке проектов федеральных, отраслевых и региональных программ по проблемам эпидемиологии, микробиологии и паразитологии;

- расширять взаимодействие, контакты и проведение совместных мероприятий с родственными научными и научно-практическими обществами России, стран СНГ, Европы, Японии, Международным союзом микробиологических обществ, Федерацией Европейских микробиологов, Всемирной организацией здравоохранения и другими сообществами;

- регулярно оценивать работу профильных научных журналов.

Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 №1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации»

В соответствии с пунктом 6 статьи 46 Федерального закона от 30 марта 1999 года № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (Собрание законодательства Российской Федерации, 1999, № 14, ст. 1650; 2002, № 1 (ч. 1), ст. 2; 2003, № 2, ст. 167; № 27 (ч. 1), ст. 2700; 2004, № 35, ст. 3607; 2005, №19, ст. 1752; 2006, № 1, ст. 10; № 52 (ч. 1), ст. 5498; 2007 № 1 (ч. 1), ст. 21, ст. 29; № 27, ст. 3213; № 46, ст. 5554; № 49, ст. 6070; 2008, № 29 (ч. 1), ст. 3418; № 30 (ч. 2), ст. 3616; № 44, ст. 4984; № 52 (ч. 1), ст. 6223; 2009, № 1, ст. 17; 2010, № 40, ст. 4969; 2011, № 1, ст. 6; № 30 (ч. 1), ст. 4563; № 30 (ч. 1), ст. 4590; № 30 (ч. 1), ст. 4591; № 30 (ч. 1), ст. 4596; № 50, ст. 7359; 2012, № 24, ст. 3069, № 26, ст. 3446; 2013, № 27, ст. 3447; № 30 (ч. 1), ст. 4079; № 48, ст. 6165; 2014, № 26 (ч. 1), ст. 3366, ст. 3377; 2015, № 1 (ч. 1), ст. 11; № 27, ст. 3951; № 29 (ч. 1), ст. 4334, ст. 4359; 2016, № 27 (ч. 1), ст. 4160; № 27 (ч. 2), ст. 4238; 2017, № 27, ст. 3938) и в соответствии с пунктом 5.4, 5.5, 5.7. Положения о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 30 июня 2004 г. № 322 (Собрание законодательства Российской Федерации, 2004, № 28, ст. 2899; 2006, № 22, ст. 2337, № 52 (ч. III), ст. 5587; 2008, № 40, ст. 4548, № 46, ст. 5337; 2009, № 30, ст. 3823, № 33, ст. 4081; 2010, № 9, ст. 960, № 26, ст. 3350; 2011, № 14, ст. 1935, № 43, ст. 6079, № 44, ст. 6272; 2012, № 27, ст. 3729; 2013, № 5, ст. 405, № 22, ст. 2812, № 45, ст. 5812; 2015, № 2, ст. 491, № 131, ст. 4680; 2016, № 28, ст. 4741; 2017, № 5, ст. 807, № 39, ст. 5705), пунктами 3 и 10 Положения о проведении социально-гигиенического мониторинга, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 2 февраля 2006 г. № 60 (Собрание законодательства Российской Федерации, 2006, № 6, ст. 713), п. 13 Положения о разграничении полномочий Федеральных органов исполнительной власти в области обеспечения биологической и химической безопасности Российской Федерации, утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации от 31.05.2005 № 303 «О разграничении полномочий федеральных органов исполнительной власти в области обеспечения биологической и химической безопасности Российской Федерации» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2005, № 21, ст. 2023; 2013, № 24, ст. 2999; 2009, № 6, ст. 738), в целях оптимизации системы

мониторинга и лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации патогенных биологических агентов (ПБА) в Российской Федерации приказываю:

1. Утвердить:

1.1. Перечень Центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противозидемической готовности, созданных на базе противочумных учреждений, перечень Опорных баз Центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности, созданных на базе ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии», перечень научно-методических центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности с прикрепленными субъектами Российской Федерации (приложение №1);

1.2. Перечень референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней, центров лабораторной диагностики и научно-методических центров по отдельным направлениям деятельности с микроорганизмами (приложение №2);

1.3. Перечень Центров верификации диагностической деятельности, осуществляющих функции государственных коллекций патогенных микроорганизмов (приложение №3);

1.4. Положение о Центре индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противозидемической готовности (приложение №4);

1.5. Положение об Опорной базе Центра индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности (приложение №5);

1.6. Положение о Научно-методическом центре по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности (приложение №6);

1.7. Положение о Референс-центре по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней (приложение №7);

1.8. Положение о Центре верификации диагностической деятельности (приложение №8);

1.9. Стандарты оснащения и номенклатуру исследований центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противозидемической готовности, опорных баз центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности, референс-центров по мониторингу за возбудителями инфек-

ционных и паразитарных болезней, центров верификации диагностической деятельности (приложение №9);

1.10. Порядок взаимодействия федеральных бюджетных учреждений здравоохранения – центров гигиены и эпидемиологии, центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, научно-методических центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности, референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней, центров верификации диагностической деятельности (приложение №10);

1.11. Перечень диагностических препаратов для оснащения центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности (приложение №11).

2. Руководителям территориальных органов Роспотребнадзора, главным врачам федеральных бюджетных учреждений здравоохранения – центров гигиены и эпидемиологии, директорам противочумных учреждений и научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора:

2.1. Обеспечить проведение мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в рамках единой системы на территориальном, региональном и федеральном уровнях в соответствии с действующим санитарным законодательством, нормативными правовыми документами;

2.2. Обеспечить взаимодействие федеральных бюджетных учреждений здравоохранения – центров гигиены и эпидемиологии, центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, научно-методических центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности, референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней, центров верификации диагностической деятельности в соответствии с приложениями №10 к настоящему приказу.

3. Главным врачам федеральных бюджетных учреждений здравоохранения – центров гигиены и эпидемиологии, директорам противочумных учреждений и научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора:

3.1. Обеспечить взаимодействие и разработать схемы доставки проб биологического материала и объектов окружающей среды в центры индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, выделенных культур микроорганизмов, биологического материала в референс-центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней и центры верификации диагностической деятельности в соответствии с утвержденным порядком взаимодействия и действующими нормативными методическими документами;

3.2. Принять меры по укреплению материально-технической базы лабораторий, дооснащению их необходимыми приборами и оборудованием для проведения мониторинга и лабораторной индикации инфекционных и паразитарных болезней, обеспечения требований биологической безопасности согласно приложению №9 к настоящему приказу;

3.3. Обеспечить проведение мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней в соответствии с действующим санитарным законодательством, нормативными правовыми и методическими документами с использованием зарегистрированных в Российской Федерации в установленном порядке диагностических препаратов;

3.4. Обеспечить внедрение в работу лабораторий современных методов диагностики, индикации и идентификации возбудителей инфекционных и паразитарных болезней;

3.5. Обеспечить регулярную подготовку специалистов по вопросам современной лабораторной диагностики, индикации и идентификации возбудителей инфекционных и паразитарных болезней.

4. Директорам научно-исследовательских противочумных институтов Роспотребнадзора обеспечить готовность лабораторий из состава специализированных противоэпидемических бригад (далее – СПЭБ) для усиления органов и организаций Роспотребнадзора.

5. Директорам противочумных учреждений Роспотребнадзора:

5.1. Обеспечить оказание практической и методической помощи органам и организациям Роспотребнадзора, медицинским организациям по вопросам организации и проведения мониторинга инфекционных болезней, эпидемиологического надзора и профилактики природно-очаговых, зооантропонозных и опасных инфекционных болезней человека;

5.2. Обеспечить противоэпидемическую готовность противочумных учреждений по особо опасным инфекционным болезням в случае эпидемических осложнений на территории закрепленных субъектов;

5.3. Обеспечить оснащение центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности диагностическими препаратами для индикации ПБА согласно приложению №11.

6. Руководителям центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, научно-методических центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности, референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней и центров верификации диагностической деятельности:

6.1. Организовать работу согласно приложениям №№4–8 к настоящему приказу;

6.2. Обеспечить взаимодействие с органами и организациями Роспотребнадзора в закрепленных субъектах Российской Федерации в соответствии с действующим санитарным законодательством и настоящим приказом.

7. Главным врачам федеральных бюджетных учреждений здравоохранения – центров гигиены и эпидемиологии, руководителям противочумных учреждений, на базе которых формируются опорные базы центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности, обеспечить наличие условий для проведения индикации ПБА I группы патогенности и получение санитарно-эпидемиологического заключения на соответствие условий требованиям санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работ с микроорганизмами I–II групп патогенности.

8. Руководителям Центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, научно-методических центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности осуществлять контроль готовности к проведению мониторинга и лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» на закрепленной территории. Информацию представлять в Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека ежегодно до 15 марта следующего за отчетным года.

9. Начальнику Управления эпидемиологического надзора (Е.Б.Ежлова) осуществлять координацию деятельности Центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, научно-методических центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности, референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитар-

ных болезней и центров верификации диагностической деятельности.

10. Начальнику Финансово-экономического управления (С.А.Румянцева) предусмотреть дополнительные средства на укрепление материально-технической базы лабораторий центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, опорных баз центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности, референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней и центров верификации диагностической деятельности.

11. Приказ Роспотребнадзора от 17.03.2008 №88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» считать утратившим силу.

12. Контроль за исполнением настоящего приказа оставляю за собой.

Руководитель А.Ю.Попова

Приложение №1

к приказу Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от _____ 2017 г. № _____

**Перечень
центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, опорных баз центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности, научно-методических центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности**

Субъекты	Центры индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности	Опорные базы центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности	Научно-методические центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности
Центральный федеральный округ			
Белгородская, Брянская, Владимирская, Воронежская, Ивановская, Калужская, Костромская, Курская, Липецкая, Московская, Орловская, Рязанская, Смоленская, Тамбовская, Тверская, Тульская и Ярославская области, г. Москва	ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора	ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Воронежской области» ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Курской области» ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тверской области» ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области»	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора» ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Северо-Западный федеральный округ			
Республики Карелия, Коми, Ненецкий автономный округ, Архангельская, Вологодская, Калининградская, Ленинградская, Мурманская, Новгородская и Псковская области, г. Санкт-Петербург	ФКУЗ «Северо-Западная противочумная станция» Роспотребнадзора	ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Мурманской области» ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калининградской области»	ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора
Приволжский федеральный округ			
Республики Башкортостан, Марий Эл, Мордовия, Татарстан, Удмуртская и Чувашская Республики, Пермский край, Нижегородская, Оренбургская, Пензенская, Самарская, Саратовская и Ульяновская области	ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора	ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Нижегородской области» ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Самарской области» ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан» ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия»	ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора
Кировская область	ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора	ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Кировской области»	

Приложение №1. Окончание

Субъекты	Центры индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противозидемической готовности	Опорные базы центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности	Научно-методические центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности
Уральский федеральный округ			
Курганская, Свердловская, Челябинская области	ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора	ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области»	ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Роспотребнадзора
Тюменская область, Ханты-Мансийский и Ямало-Ненецкий автономные округа	ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора	ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области» ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ямало-Ненецком автономном округе»	ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора
Южный федеральный округ			
Республика Адыгея, Краснодарский край	ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция» Роспотребнадзора	Противочумное отделение ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция» Роспотребнадзора в г. Сочи	ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
Волгоградская область	ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора		
Астраханская область	ФКУЗ «Астраханская ПЧС» Роспотребнадзора		
Республика Калмыкия	ФКУЗ «Элистинская ПЧС» Роспотребнадзора		
Республика Крым, г. Севастополь	ФГКУЗ «ПЧС Республики Крым» Роспотребнадзора		
Ростовская область	ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора		ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора
Северо-Кавказский федеральный округ			
Республика Северная Осетия-Алания, Ингушская и Чеченская Республики, Ставропольский край	ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора		ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
Республика Дагестан	ФКУЗ «Дагестанская противочумная станция» Роспотребнадзора		
Кабардино-Балкарская и Карачаево-Черкесская Республики	ФКУЗ «Кабардино-Балкарская противочумная станция» Роспотребнадзора		
Сибирский федеральный округ			
Республика Хакасия, Красноярский край, Иркутская, Кемеровская, Новосибирская, Омская, Томская области	ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора	ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае»	ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора
Республика Алтай, Алтайский край	ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора		
Республика Тыва	ФКУЗ «Тувинская противочумная станция» Роспотребнадзора		
Республика Бурятия, Забайкальский край	ФКУЗ «Читинская противочумная станция» Роспотребнадзора		
Дальневосточный федеральный округ			
Республика Саха (Якутия)	ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора	ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Саха (Якутия)»	ФБУН «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора
Камчатский, Приморский края	ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора	ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Камчатской области»	
Хабаровский край, Амурская, Магаданская, Сахалинская области, Еврейская автономная область, Чукотский автономный округ	ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция» Роспотребнадзора	ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Сахалинской области» ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Магаданской области» ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Амурской области»	

Приложение №2

к приказу Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
от _____ 2017 г. № _____

**Перечень
референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней,
центров лабораторной диагностики и научно-методических центров по отдельным направлениям деятельности
с микроорганизмами**

№ п/п	Наименование учреждения	Референс-центры, центры лабораторной диагностики и научно-методические центры
1.	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу: • за вирусными гепатитами; • ИСМП; • сальмонеллезами; • ОКИ; • ВИЧ и ВИЧ-ассоциированными инфекциями; • бактериальными менингитами; • инфекциями верхних и нижних дыхательных путей; • ИПП Научно-методический центр по иммунопрофилактике
2.	ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу: • за иерсиниозами; • брюшным тифом
3.	ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу: • за корью; • краснухой; • эпидемическим паротитом; • коклюшем; • дифтерией Научно-методический центр по изучению и идентификации бактериофагов
4.	ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»	Референс-центр по мониторингу: • за туляремией; • клостридиозами; • легионеллезами; • листериозом; • эшерихиозом; • стафилококковыми инфекциями
5.	ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу за чумой и другими особо опасными бактериальными инфекционными болезнями
6.	ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу за ларвальными гельминтозами
7.	ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу за биогельминтозами
8.	ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу за холерой
9.	ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу: • за сибирской язвой; • бруцеллезом; • крымской геморрагической лихорадкой
10.	ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу: • за особо опасными микозами; • сапом, мелиоидозом; • лихорадкой Западного Нила; • лихорадкой Зика
11.	ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу: • за клещевым вирусным энцефалитом
12.	ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу: • за риккетсиозами; • боррелиозами; • бешенством
13.	ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу: • за ортопоксвирусными и другими особо опасными вирусными инфекционными болезнями; • зоонозным гриппом, вызванным высокопатогенными штаммами; • экзотическими, редко встречающимися, новыми инфекционными болезнями (лихорадка денге, желтая лихорадка, лихорадка чикунгунья и др.); • коронавирусными инфекционными болезнями (ТОРС, БВРС и др.); • ВИЧ
14.	ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу: • за энтеровирусными инфекциями

Приложение №2. Окончание

№ п/п	Наименование учреждения	Референс-центры, центры лабораторной диагностики и научно-методические центры
15	ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора	Референс-центр по мониторингу: • за геморрагической лихорадкой с почечным синдромом
16	ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации» (по согласованию)	Центр специальной лабораторной диагностики особо опасных и экзотических заболеваний
17.	Научно-исследовательский институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (по согласованию)	Референс-центр по мониторингу: • за малярией; • филяриозами; • лейшманиозами
18.	ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (по согласованию)	Референс-центр по мониторингу: • за полиомиелитом; • ГЛПС
19	ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава (по согласованию)	Референс-центр по мониторингу за гриппом
20	ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (по согласованию)	Референс-центр: • по экологии вирусов гриппа; • по мониторингу за лептоспирозами
21	ФБУН «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзор	Научно-методический центр по неспецифической профилактике инфекционных болезней и мониторингу устойчивости биологических агентов к дезинфекционным средствам
22	ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Роспотребнадзора	Урало-Сибирский научно-методический центр по профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи

Приложение №3

к приказу Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
от _____ 2017 г. № _____

**Перечень
Центров верификации диагностической деятельности,
осуществляющих функции государственных коллекций Роспотребнадзора**

№ п/п	Учреждение	Референс-функции	Хранение коллекционных штаммов
1.	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора	Возбудители вирусных инфекционных болезней, риккетсиозов их геномы и генетические элементы	Возбудители вирусных инфекционных болезней, риккетсиозов их геномы и генетические элементы
2.	ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора	Возбудители инфекционных болезней I–IV групп патогенности их геномы и генетические элементы, токсины, клеточные культуры	Возбудители инфекционных болезней I–IV групп патогенности их геномы и генетические элементы, токсины, клеточные культуры
3.	ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»»	Возбудители бактериальных инфекционных болезней I–IV групп патогенности их геномы и генетические элементы	Возбудители бактериальных инфекционных болезней I–IV групп патогенности их геномы и генетические элементы

С полной версией приказа можно ознакомиться по адресу:

<http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/a2e/prikaz-1116-okonchat-29.12.2017.pdf>

**Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИКО-СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ А.И. ЕВДОКИМОВА**



ФОРУМ УНИВЕРСИТЕТСКОЙ НАУКИ – 2018

**«НАУЧНОЕ МЕДИЦИНСКОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ,
ТРИГГЕРЫ ПАТОГЕНЕЗА, ЯТРОГЕННЫЕ ВЛИЯНИЯ»**

15 мая 2018 года, г. Москва, отель «Рэдиссон Славянская»

СИМПОЗИУМ

**Бактериофаги в современной клинической медицине – «за» и «против»,
посвященный 50-летию лечебного факультета и 75-летию
кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии
Московского государственного медико-стоматологического
университета имени А.И. Евдокимова**

Глубокоуважаемые коллеги!

Приглашаем вас принять участие в работе Симпозиума с международным участием «*Бактериофаги в современной клинической медицине – «за» и «против»*», посвященной 50-летию лечебного факультета и 75-летию кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова.

Место проведения Форума Университетской Науки – г. Москва, площадь Европы, д. 1. Гостиница «Рэдиссон Славянская» (проезд до метро Киевская). Дата проведения Форума – 15 мая 2018 г., время: 9.00–18.00.

Время проведения юбилейного Симпозиума: 12.30–18.00.

Программа Форума предусматривает обсуждение широкого круга учебно-методических и научных вопросов в области фундаментальной, прикладной и клинической медицины, медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии.

В рамках Форума Университетской Науки запланирован **сертификационный цикл** повышения квалификации для профессоров и заведующих профильными кафедрами с **11 по 18 мая 2018 г.** на базе кафедр педагогики; микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И.Евдокимова. Кроме того, при регистрации на Форуме Университетской Науки участникам будут предоставлены кредиты НМО в объеме 18 баллов.

Официальные языки Форума – русский и английский.

Формы участия в симпозиуме:

- устный доклад на заседаниях Форума (с публикацией статьи);
- участие в заседаниях Форума без представления доклада (с публикацией статьи или без);
- публикация (без личного участия или с личным участием в заседаниях Форума).

Заявка на участие в Симпозиуме (регистрационная форма) и материалы для публикации должны быть представлены в Оргкомитет Конференции строго до 1 апреля 2018 г. Материалы, поступившие позже указанного срока, приниматься не будут. При подготовке докладов просим Вас учесть, что максимальное время устного сообщения не должно превышать 15 минут. Иллюстративные материалы к докладу будут демонстрироваться через мультимедийный проектор. Файл с презентацией следует представить в Оргкомитет на диске (CD или DVD) или flash-носителе перед началом заседания Конференции.

Публикация материалов планируется в журнале «Бактериология, 2018, №2» и должна соответствовать требованиям журнала (см. далее). Объем публикации ограничен 5–7 страницами, допустимы и желательны таблицы, рисунки и фотографии; обязательно – ключевые слова, резюме на русском и английском языке.

Материалы участника Конференции направляются в Оргкомитет по электронной почте на адрес **podporin.mikhail@yandex.ru** в виде прилагаемых к почтовому сообщению файлов, названных по фамилии первого автора на русском языке. Например, для участника Иванова А.В.: статья – Иванов А.В.doc; регистрационная форма – Иванов А.В.reg.doc.

Регистрационная форма

Фамилия, имя, отчество	
Ученая степень	
Ученое звание	
Город, регион	
Место работы	
Должность	
Адрес для переписки (с индексом)	
Телефон/Факс (указать код страны и города)	
E-mail	
Форма участия	
Прохождение сертификационного цикла	
Название доклада (статьи)	
Потребность в гостинице	
Дата	

Требования к публикации материалов в журнале «Бактериология»

К публикации принимаются экспериментальные, обзорные статьи и краткие сообщения на русском языке. Резюме и ключевые слова, названия статей – на русском и английском.

Шрифт – Times New Roman в текстовом редакторе MS Word, кегль – 14, текст – через 1,5 интервал; поля – 2 см. Каждый абзац текста – с красной строки, отступ – 1,25 см. Нумерация страниц – сквозная.

Порядок расположения абзацев в статье.

Название работы – прописными буквами, «**жирный**» шрифт, без кавычек, выравнивание абзаца по левому краю. Например:

ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОСПАЛЕНИЯ

Фамилии и инициалы авторов – «**жирный**» шрифт, выравнивание абзаца по левому краю. Например:

Иванов А.В.¹, Петров С.К.², Прохоров И.М.²

Название учреждения обычным шрифтом: ¹Первая организация, Москва, РФ; ²Вторая организация, Техас, США (если есть).

С четвертого абзаца через пустой интервал начинается текст статьи.

Текст статьи, включая резюме (не более 250 слов), ключевые слова (не более 10), подписи к рисункам, таблицы, список литературы, список литературы с транслитерацией и данные на авторов (на русском и английском языке) оформляются одним файлом, рисунки, фотографии представляются дополнительно в формате JPG и т.п.

Если работа выполнена при поддержке грантов, спонсоров и т.д., то соответствующие благодарности могут быть указаны в конце текста и учитываются в общем объеме представленных тезисов.

Экспериментальная статья должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы, транслитерированный список, выходные данные на авторов. Например:

Для корреспонденции:

Царёв Виктор Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова

Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1

Телефон: 8 (903) 756 12 58

E-mail: nikola777@rambler.ru

For correspondence:

Viktor N. Tsarev Sc.D.(Med), professor. Director of Research Institute of Medicine and Dentistry, Head of Department by microbiology, virology and immunology of Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Yevdokimov
Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: 8 (903) 756 12 58
E-mail: nikola777@rambler.ru

Информация об авторах:

Подпорин Михаил Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова
Адрес: 123425, Москва, ул. Деlegatesкая, 20/1
Телефон: (915) 401-9131
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Information about authors:

Mikhail S. Podporin, Junior research associate, laboratory of Molecular biology investigation, Research Institute of Medicine and Dentistry of Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov
Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (915) 401-9131
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Рисунки и таблицы размещаются в тексте статьи по желанию авторов. Кроме того, черно-белые и цветные рисунки (в формате JPG) прилагаются к статье в виде отдельных файлов с соответствующей нумерацией (ris1.jpg, ris2.jpg и т.д.).

По всем вопросам, связанным с публикацией материалов, а также с организацией и проведением Симпозиума и других мероприятий Форума Университетской Науки – 2018, обращаться в Оргкомитет Симпозиума:

(1) Ипполитов Евгений Валерьевич,

зав. отделом фундаментальных исследований НИМСИ, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии.

Тел.: (8-903) 292-15-17; **e-mail:** ipro@bk.ru

(2) Подпорин Михаил Сергеевич,

помощник директора НИМСИ, старший лаборант кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии.

Тел.: (8-985) 491-18-54; **e-mail:** podporin.mikhail@yandex.ru

Предварительную информацию о других секциях Форума Университетской Науки можно найти на сайте «Форум университетской науки – 2018» по ссылке «Секции форума»

Будем рады встрече с вами на Форуме Университетской Науки – 2018!

С наилучшими пожеланиями!

Член Оргкомитета Форума Университетской Науки – 2018 и сопредседатель симпозиума

«Бактериофаги в современной клинической медицине – «за» и «против»,

директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава Российской Федерации,

Заслуженный работник высшей школы Российской Федерации,

доктор медицинских наук, профессор

Царёв Виктор Николаевич

Сопредседатель симпозиума

«Бактериофаги в современной клинической медицине – «за» и «против»,

заведующий лабораторией бактериофагов НИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, профессор кафедры клинической микробиологии и фаготерапии факультета дополнительного профессионального образования МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава Российской Федерации,

доктор медицинских наук, профессор

Алёшкин Андрей Владимирович

Адрес Оргкомитета Симпозиума:

119017, г. Москва, Деlegatesкая 20/1, каб. 417

ГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, дирекция НИМСИ Тел.: (8-985) 491-18-54

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 приказа на осуществление образовательной деятельности в области ДПО №1912 от 4 октября 2011г.).

Контактная информация:

Поталов Василий Дмитриевич – зам.директора отдела подготовки и усовершенствования специалистов д.б.н. тел.: +7 (916) 521-66-53

Кузин Виктор Владимирович – директор отдела подготовки и усовершенствования специалистов тел.: 7 (4967) 31-21-82

E-mail: kuzin@obolensk.org

Подробная информация

www.obolensk.org Дополнительное профессиональное образование



Николай Николаевич Ураков

28 апреля 2017 г. ушел из жизни Николай Николаевич Ураков, доктор медицинских наук, профессор, генерал-майор медицинской службы, заслуженный деятель науки Российской Федерации, бывший директор Государственного научного центра прикладной микробиологии.

Н.Н.Ураков родился 16.11.1929 в деревне Ермолино Шарангского района Горьковской (ныне Нижегородской) области в семье рабочего. После окончания школы в 1948 г. учился в Горьковском медицинском институте и Военно-медицинской академии им. С.М.Кирова. С 1954 г. служил на различных должностях в научно-исследовательских институтах Министерства обороны СССР (Загорск, Киров). Специализировался в области медицинской вирусологии и микробиологии, аэриологии и инфекционной патологии, диагностики, иммунопрофилактики и лечения инфекционных болезней, генетики и биотехнологии.

В 1982 г. возглавил ВНИИ прикладной микробиологии – впоследствии Государственный научный центр прикладной микробиологии (п. Оболенск, Московская область). В этот период завершилось строительство научного комплекса общей площадью более 90 тыс. кв. м, включая основной лабораторный корпус №1. Общее число сотрудников института в 1991 г. достигало 3000 человек. На карте страны появился поселок ученых Оболенск. В июне 1994 г. ВНИИ ПМ был присвоен статус государственного научного центра.

Под руководством Н.Н. Уракова впервые была разработана отечественная технология получения генно-инженерного инсулина человека, которая в дальнейшем была реализована в ЗАО «Национальные биотехнологии», ныне «ГЕРОФАРМ-БИО».

В начале 90-х гг. прошлого века в ГНЦ ПМ было создано и успешно развивается опытно-промышленное производство диагностических питательных сред, ныне занимающее значительную долю российского рынка.

С конца 1990-х гг. при непосредственном участии Н.Н.Уракова ГНЦ ПМ активно включился в международное научно-техническое сотрудничество. Около 10 лет сотрудники Центра во Вьетнаме разрабатывали технологии получе-



ния биопестицидов, налаживали производство средств защиты растений на основе микроорганизмов, проводили поиск микроорганизмов-деструкторов хлорорганических соединений. С 1995 г. ГНЦ ПМ выполняет проекты при финансовой и консультативной поддержке ряда международных фондов. При финансовой и организационной поддержке МНТЦ на базе ГНЦ ПМ впервые состоялось несколько международных научных конференций и семинаров.

Как директор градообразующего предприятия, Николай Николаевич уделял большое внимание Оболенску. Вопросы благоустройства поселка, строительство и оснащение школы и детсада, Дома культуры, телефонизация поселка, организация транспортного сообщения с близлежащими городами, формирование дачных и коттеджных кооперативов – вот неполный перечень проблем, решенных под руководством Н.Н. Уракова.

Заслуги Николая Николаевича Уракова перед Родиной отмечены орденами «Знак почета», «Трудового Красного Знамени», «За службу Родине в Вооруженных Силах СССР», «За заслуги перед Отечеством», 8 медалями.

Н.Н.Ураков – автор более 180 научных трудов, основатель авторитетной научной школы, включающей 8 докторов и 21 кандидата наук.

Его общественная деятельность отмечена званием «Почетный гражданин Серпуховского района».

Дмитрий Владимирович Виноградов–Волжинский

15 октября 2017 г. скончался известный ученый-паразитолог, доктор медицинских наук, профессор, генерал-майор медицинской службы, первый директор Всесоюзного научно-исследовательского института прикладной микробиологии (ныне Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии) Дмитрий Владимирович Виноградов–Волжинский.

Дмитрий Владимирович родился 2 марта 1925 г. в Ленинграде в семье российских интеллигентов. Его отец, В.А.Виноградов–Волжинский (1891–1942), был учеником профессора Ф.Ф.Эрисмана, специализировался в области военной гигиены. Дядя, И.А.Виноградов–Волжинский (1896–1963 гг.), был ближайшим сотрудником С.В.Лебедева и занимался разработкой синтетического каучука.

Дмитрий Владимирович пошел по стопам отца, выбрав профессию военного медика. В 1947 г. он окончил Военно-медицинскую академию и был оставлен адъюнктом при кафедре биологии и паразитологии. С 1952 по 1964 гг. служил на разных должностях в научно-исследовательских учреждениях Министерства обороны СССР. В 1966–1971 гг. он заведовал кафедрой эпидемиологии с курсом паразитологии, был проректором по научной части Ленинградского санитарно-гигиенического медицинского института. В этот же период был председателем правления Русского паразитологического общества.

В 1970 г. Дмитрия Владимировича снова призывают на службу в Вооруженные Силы СССР. С 1970 по 1975 гг. он возглавлял кафедру био-



логии и паразитологии Военно-медицинской академии имени С.М.Кирова.

В 1975 г. Дмитрий Владимирович возглавил ВНИИ ПМ, которым руководил до 1982 г. В этот период были разработаны проекты и начато строительство ВНИИ ПМ и жилого поселка. Был сформирован костяк коллектива ученых и специалистов, многие из которых работают в институте и сегодня. Были получены первые научные результаты, защищены кандидатские и докторские диссертации.

Д.В.Виноградов–Волжинский – автор более 150 научных работ, включая монографии «Эпидемический паротит» (1976), «Медицинская паразитология» (1977), «Эпидемиология» (1973), «Карантинные болезни» (1975) и др., входил в редколлегия Краткой медицинской энциклопедии. Награжден орденами Красной Звезды и «За службу Родине в ВС СССР» 3-й степени, медалями.

Клец Элиазар Исаакович (к 120-летию со дня рождения)

22 ноября 2017 г. исполнилось 120 лет со дня рождения Элиазара Исааковича Клеца (1897–1991) – бывшего старшего научного сотрудника отдела эпидемиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, в котором он работал со дня его основания. Его деятельность была связана и с Иркутским медицинским институтом, где он работал на кафедре микробиологии ассистентом, доцентом и заведующим. Элиазар Исаакович родился в г. Иркутске в семье рабочего. Окончив Иркутскую губернскую гимназию в 1917 г., поступил на медицинский факультет Томского университета. Однако учеба была прервана, так как его в 1919 г. призвали на военную службу в связи с событиями гражданской войны, и он работал в Иркутском военном госпитале. В 1920 г. продолжил учебу в Томске, а в 1922 г. перевелся на медицинский факультет Иркутского университета, который закончил в 1924 г. Как одного из самых способных студентов его оставили ординатором-лаборантом клиники факультетской хирургии. С этого времени он начал заниматься научной работой, и в 1925 г. вышла его первая печатная работа о послеоперационной ацетонурии и ее клиническом значении.

В 1926–1930 гг. Э.И.Клец обучался в аспирантуре на кафедре микробиологии Иркутского медицинского института и с 1930 г. стал ассистентом этой кафедры. Во время прохождения аспирантуры он работал в противочумной лаборатории Химико-бактериологического института (Химбактина) в должности врача. В 1935 г. по теме «Бартонелла мурис в Сибири» защитил кандидатскую диссертацию. В 1937 г. ему присвоено звание доцента, а на следующий год он становится заведующим кафедрой микробиологии Иркутского медицинского института.

Со дня основания Иркутского противочумного института (1934) и до 1937 г. Клец Э.И. работал по совместительству в эпидемиологическом отделе и был первым и единственным научным сотрудником. В 1940–1941 г. проходил докторантуру во Всесоюзном институте экспериментальной медицины (Ленинград), но не закончил ее, так как 26 июня 1941 г. был призван в армию. В составе действующей армии в качестве эпидемиолога служил на Ленинградском



и Первом Дальневосточном фронтах (война с Японией). В 1948 г. он уволился в запас в звании подполковника медицинской службы. Вернувшись в Иркутск, в 1948–1949 гг. исполнял обязанности доцента кафедры микробиологии медицинского института. В 1949 г. Э.И.Клец был утвержден заместителем директора по научной части Иркутского противочумного института. Но в 1952 г. в связи с болезнью он перешел на должность старшего научного сотрудника эпидемиологического отдела, где и работал до ухода на пенсию (1976).

За годы работы в противочумном институте Э.И.Клец внес существенный вклад в изучение эпидемиологии, микробиологии и иммунологии чумы, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы, псевдотуберкулеза и других инфекционных заболеваний. Однако основным направлением его научных исследований была вакцинопрофилактика особо опасных инфекций. В результате комплексных экспериментальных работ с патоморфологами на животных им впервые показаны иммуногенность и безвредность одновре-

менного введения трех антигенов – чумного, туляремийного и бруцеллезного. Было установлено, что ассоциированная тривакцина обеспечивает устойчивость к этим инфекционным болезням при различных способах введения. В этот же период была проведена серия экспериментальных исследований по определению восприимчивости лабораторных и диких животных к возбудителю чумы и длительности его сохранения в объектах окружающей среды. По материалам исследований было опубликовано свыше 100 научных работ, ученый подготовил значительное количество научных отчетов. Он выступал с докладами на международных, всесоюзных, региональных конференциях и в институте.

Элиазар Исаакович уделял особое внимание подготовке врачей по особо опасным инфекциям и общего профиля в противочумном и медицинском институтах. Регулярно осуществлял консультативную помощь специалистам подведомственных противочумных учреждений. Под его руководством выполнены три кандидатские диссертации.

Наряду с научной деятельностью Э.И.Клец много сил и энергии отдавал оперативной работе, постоянно участвуя в экспедициях по обследованию территорий природных очагов. Он неоднократно принимал участие в ликвидации вспышек туляремии на территории населенных пунктов Нижнеудинского района Иркутской области. Под его руководством расшифрована эпизоотия сибирской язвы в Газимуро-Заводском районе Забайкалья (1954 г.).

За участие в Великой Отечественной войне, включая войну с Японией, а также многолетний плодотворный труд Э.И.Клец награжден «Орденом Ленина», «Орденом Красной Звезды», «Орденом Отечественной войны II степени» и

11 медалями: «За оборону Ленинграда», «За победу над Германией», «За победу над Японией», «20, 30 и 40 лет победы в Великой Отечественной войне», «50 и 60 лет Вооруженных сил СССР», «В память 250-летия Ленинграда», «Знак 25 лет победы в Великой Отечественной войне», «Ветеран труда», а также нагрудным знаком «Отличнику здравоохранения», почетными грамотами МЗ СССР, многих областных и республиканских администраций.

Э.И. Клец – один из ветеранов сибирской противочумной системы, выдающийся микробиолог. Это был эрудированный, тактичный, интеллигентный и очень скромный человек, он никому не отказывал в дружеской поддержке. Результаты его разносторонних исследований не утратили свою ценность до настоящего времени и являются образцом служения науке и практическому здравоохранению нашей страны.

*Воронова Галина Александровна,
кандидат медицинских наук, доцент, старший
научный сотрудник отдела эпидемиологии
ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт» Роспотребнадзора*

*Урбанович Людмила Яковлевна,
доктор медицинских наук,
старший научный сотрудник лаборатории
холеры ФКУЗ «Иркутский
научно-исследовательский противочумный
институт» Роспотребнадзора*

*Бондарь Екатерина Васильевна,
студентка шестого курса лечебного
факультета ФГБОУ ВО «Иркутский
государственный медицинский университет»,
Иркутск, Российская Федерация*