

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2018 • том 3 • №2

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Н а у ч н о - п р а к т и ч е с к и й ж у р н а л

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.А.Базиков, д.м.н., проф. (Россия)
В.А.Горбунов, к.м.н. (Белоруссия)
В.А.Давидянц, д.б.н., проф. (Армения)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)
Л.В.Домотенко, к.х.н. (Россия)
Г.А.Каримова, к.б.н. (Франция)
А.В.Карлышев, к.х.н., проф. (Англия)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)
М.Косой, к.б.н. (США)
Ш.Х.О.Курбанов, к.м.н. (Азербайджан)

И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Узбекистан)
Т.В.Мека-Меченко, д.м.н. (Казахстан)
В.Л.Мотин, проф. (США)
А.Ракин (Германия)
Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
К.Ю.Шаталин, к.б.н. (США)
И.Г.Шемякин, д.б.н., проф. (Россия)
А.П.Шепелин, д.б.н. (Россия)

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
Подписной индекс по объединенному
каталогу «Пресса России»: 39920

Колонка главного редактора

О новых подходах к изучению антибиотикорезистентности и персистенции бактерий как основе для разработки эффективных средств лечения инфекций

И.А.Дятлов 5

Оценка репаративной способности, антимикробной и лимфоцитарной активности ниосомального геля «Регенерин» в стоматологической практике

И.А.Базиков, А.А.Долгалева, А.Н.Квочко, В.А.Зеленский, М.А.Матюта, А.А.Долгалева, Е.А.Гоптарева, В.И.Королькова. 7

Микробиологическое обоснование выбора антибиотикотерапии при осложнениях дентальной имплантации

Л.Я.Плахтий, Е.И.Гатиева, А.Ч.Цховребов, Т.В.Царёва, М.С.Подпорин 12

Исследование антимикробной активности кумариновых субстанций в отношении *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*

А.Н.Евстропов, Л.Г.Бурова, И.В.Широких, А.В.Липеева, Э.Э.Шульц. 16

Применение экспресс-метода лазерной флуоресцентной спектроскопии для определения чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам

Е.В.Ипполитов, Д.В.Давыдов, В.В.Царёва, А.А.Лабазанов, М.С.Подпорин 20

Значение оценки респираторного метаболизма лейкоцитов при разработке местной лекарственной формы для лечения пародонтальной инфекции

Т.П.Герасимова, Е.Н.Николаева, Р.В.Ушаков, Е.В.Ипполитов, А.Р.Ушаков, В.Н.Царёв 24

Молекулярная диагностика пародонтита и метагеномный анализ микробиоты пародонта у пациентов с сахарным диабетом II типа

В.Н.Царёв, С.Д.Арутюнов, И.П.Балмасова, Э.А.Бабаев, Е.Н.Николаева, Е.В.Ипполитов, Е.Н.Ильина, А.Г.Габибов 30

Плазмидная криотрансформация вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ

Н.А.Шишкова, Г.М.Вахрамеева, В.М.Павлов, А.Н.Мокриевич, И.А.Дятлов. 38

Применение рекомбинантного аттенуированного штамма MVA вируса вакцины в качестве векторной вакцины для иммунизации против туберкулеза

Д.И.Павельев, Л.Ф.Стовба, М.Н.Писцов, В.Н.Лебедев, С.В.Борисевич 43

Актуальные аспекты преподавания микробиологии в медицинском вузе и подготовки врачей-микробиологов на современном этапе

Г.Ш.Исаева, С.Н.Габидуллина 51

Филогенетика, эволюция и филогеография *Bacillus anthracis*

Е.И.Еременко, С.В.Писаренко, Л.Ю.Аксенова, А.Г.Рязанова, А.М.Жиров, О.В.Семенова, О.В.Бобрышева, Д.А.Ковалев, А.Н.Куличенко. 57

Выявление стафилококков при использовании современных импортозамещающих питательных сред

А.П.Шепелин, А.Б.Сергеева, О.В.Полосенко 64

V Форум Университетской Науки «Научное медицинское прогнозирование:

молекулярно-генетические аспекты, триггеры патогенеза, ятрогенные влияния» 72

Юбилей

Исторический очерк к 75-летию кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии

Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И.Евдокимова. 74

Краткое сообщение

О создании Ассоциации «Национальное научно-практическое общество бактериологов» 79

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

On new approaches to studying antibiotic resistance and bacterial persistence
as a basis for development of effective drugs for management of infections

I.A.Dyatlov 5

Assessment of reparative ability, antimicrobial and lymphocytic activity
of niosomal gel «Regenerin» in dentistry practice

*I.A.Bazikov, A.A.Dolgalev, A.N.Kvochko, V.A.Zelensky, M.A.Matyuta,
A.A.Dolgaleva, E.A.Goptareva, V.I.Korolkova* 7

Microbiological objectivation for election of antibiotic therapy in the dental implantation complication

L.Ya.Plahtiy, E.I.Gatieva, A.Ch.Tshovrebov, T.V.Tsareva, M.S.Podporin 12

Study of the antimicrobial activity coumarin substances against *Staphylococcus aureus*
and *Pseudomonas aeruginosa*

A.N.Evstropov, L.G.Burova, I.V.Shirokih, A.V.Lipeeva, E.E.Shults 16

Application of the rapid method of laser fluorescence spectroscopy to determine
the sensitivity of pathogens to antibacterial drugs

E.V.Ippolitov, D.V.Davidov, V.V.Tsareva, A.A.Labazanov, M.S.Podporin 20

Leukocytes respiratory metabolism and it's evaluation for the development
of a local polymer dosage form for treatment of periodontal infection

T.P.Gerasimova, E.N.Nikolaeva, R.V.Ushakov, E.V.Ippolitov, A.R.Ushakov, V.N.Tsarev 24

Molecular diagnostic of periodontitis and metagenomic analysis of the periodontum
microbiota in patients by type II diabetes mellitus

*V.N.Tsarev, S.D.Arutunov, I.P.Balmasova, E.A.Babaev, E.N.Nikolaeva,
E.V.Ippolitov, E.N.Ilina, A.G.Gabibov* 30

Plasmids cryotransformation of vaccinia strain *Francisella tularensis* 15 NIEG

N.A.Shishkova, G.M.Vakhrameyeva, V.M.Pavlov, A.N.Mokrievich, I.A.Dyatlov 38

Use of the recombinant attenuated MVA strain of the vaccine virus as a vector vaccine
for immunization against tuberculosis

D.I.Pavelev, L.F.Stovba, M.N.Pistcov, V.N.Lebedev, S.V.Borisevich 43

Actual aspects of teaching microbiology in the medical university and training
of doctors-microbiologists at the present stage

G.Sh.Isaeva, S.N.Gabidullina 51

Phylogenetics, evolution and phylogeography of *Bacillus anthracis*

*E.I.Eremenko, S.V.Pisarenko, L.Yu.Aksenova, A.G.Ryazanova, A.M.Zhirov,
O.V.Semenova, O.V.Bobrysheva, D.A.Kovalev, A.N.Kulichenko* 57

Staphylococci identification by using modern import-replacing nutrient media

A.P.Shepelin, A.B.Sergeeva, O.V.Polosenko 64

The 5th Forum of university science «Scientific medical prognostication: molecular-genetic aspects,
triggers of pathogenesis, iatrogenic influences»

..... 72

Jubilee

A historical essay to the 75th anniversary of the department of microbiology, virology,
immunology of the A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry.

..... 74

Brief Communication

On Setting Up the Association «National Science-and-Practice Society for Bacteriologists» 79

Instructions for Authors 80

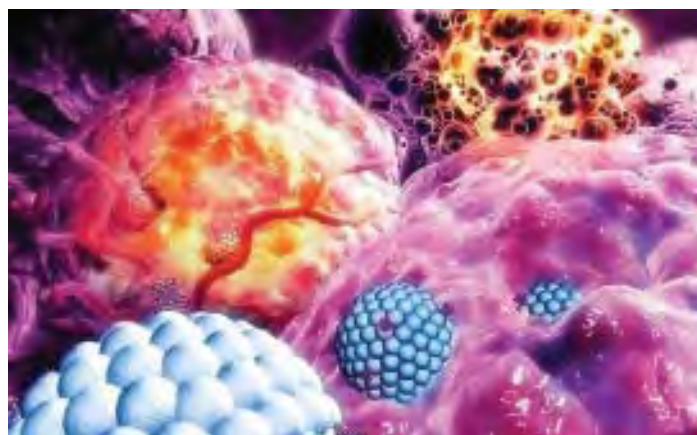
О новых подходах к изучению антибиотикорезистентности и персистенции бактерий как основе для разработки эффективных средств лечения инфекций

Хорошо известны молекулярно-генетические механизмы, обеспечивающие устойчивость бактериальных клеток к воздействию антибиотиков: модификация мишени действия антибиотика, ферментативное разрушение антибиотика, активация эффлюксных насосов, уменьшение проницаемости клеточной стенки, активация метаболического шунта. Выявлены гены, обеспечивающие функционирование этих механизмов, которые, в свою очередь, могут быть использованы в эпидемиологии для природного маркирования штаммов из различных регионов.

Данные механизмы могут обеспечивать поли- и панрезистентность к антибиотикам отдельных клонов, способных к быстрому распространению среди людей. Для лечения таких инфекций используют в основном комбинации нескольких известных антибиотиков и их сочетания с антисептиками. Однако такие подходы становятся все менее действенными в связи с быстрой адаптацией возбудителей к новым условиям и возрастающей резистентностью штаммов к антисептикам.

К сожалению, перспективных средств, которые могут рассматриваться в качестве альтернативы антибиотикам, чрезвычайно мало, и они пока не нашли широкого применения в клинической практике. Ведутся разработки в отношении использования бактериоцинов – антимикробных пептидов бактериального происхождения, дефенсинов – пептидов эукариот, узкоспецифичных бактериофагов, литических ферментов бактериофагов – эндолизин (пептидогликан-гидролаз), фаговых деполимераз (разрушающих внеклеточный полисахаридный матрикс бактерий – биопленки), ингибиторов системы кворум сенсенса, препятствующих образованию биопленок и др. Особенно перспективным является использование для данных целей генетического редактирования CRISPR-Cas-системы, на основе которой уже созданы расы бактериофагов, способных избирательно уничтожать в организме человека клетки, несущие гены антибиотикорезистентности.

Для целенаправленного создания средств, противостоящих резистентности бактерий, необходимо обратиться к современным фундаментальным разработкам в области популяционной микробиологии, достижения которой в последние годы позволили выявить ряд механизмов, обеспечивающих адаптацию клеток к присутствию антибиотиков и противодействию другим стрессорным факторам, что позволяет



сохраняться всей или части популяции в таких условиях. Информация о тонких механизмах адаптации бактерий может быть использована для разработки новых средств и методов борьбы с резистентностью.

Стрессовое действие антибиотиков может индуцировать активацию ряда генов бактерий (для каждого антибиотика разных), которые могут способствовать выработке метаболитов, приводящих к переходу части популяции в дормантное состояние, части – в толерантное состояние или собственно резистентное состояние из-за закрепления мутаций. Переход в персистирующее состояние сопровождается существенным снижением обменных процессов в клетке, прекращением синтеза АТФ, остановкой роста и размножения, что не позволяет антибиотику воздействовать на исковую мишень, а части популяции переживать неблагоприятные для нее условия.

Уже разработаны несколько экспериментальных подходов для уничтожения персисторов без участия АТФ, заключающиеся в использовании ряда ферментов аутолиза клеток, воздействии лассомицина, выделенного из некультивируемых бактерий, применении пульс-дозирования антибиотика и антибактериального препарата тейкобактина, к которому нет резистентности у бактериальных клеток.

Один из способов адаптации клеток к стрессовым воздействиям известен как токсин-анатоксин система, состоящая из белков токсина и белков или малых РНК анатоксина, которые в норме существуют в виде неактивного комплекса. Стрессы (температурные, рН, осмотические, действие анти-

биотиков, токсических веществ, фагов, голодание и др.) приводят к разрушению анатоксина, увеличению количества свободного токсина, что способствует или гибели клетки, или переходу в дормантное состояние. Существует множество типов системы токсин-анатоксин, которые действуют на уровне мембран, подавляя синтез АТФ, расщепляют различные типы РНК, влияя на процесс трансляции, подавляют репликацию ДНК. На модели кишечной палочки выяснено, что увеличение синтеза токсина HrpA приводит к увеличению числа персистирующих клеток, а удаление соответствующего гена – к их сокращению. Выявлены также многие механизмы формирования состояния персистенции. Кроме того, система токсин-анатоксин каким-то образом связана с интенсивностью образования бактериальными популяциями биопленок.

Несмотря на еще недостаточную изученность этой системы у бактерий, уже предпринимаются попытки использовать эффект апоптоза, возникающий при высвобождении токсина для борьбы с резистентными и персистирующими клетками. Для этого необходимо создать соединения, активирующие токсин, или генно-инженерный токсин, который, однако, будет иметь узкую направленность против одного вида или рода бактерий. В фундаментальных исследованиях по данной проблеме уже просматриваются выраженные аспекты практического применения для лечения инфекционных болезней.

Персистенция клеток как реакция адаптации может также быть инициирована такими факторами, как воздействие антибиотиком, окислительный стресс (образование активных форм кислорода), недостаток факторов роста (в основном аминокислот), SOS-ответ на повреждение ДНК (способствует отбору резистентных форм), активация *groS* регулона, способствующая увеличению устойчивости клеток к стрессам. Детальное исследование этих механизмов может привести к разработке методологии борьбы как с персисторными клетками, так и в целом с резистентными к антибиотикам клонами.

В настоящий период накапливается информация о природе персистенции бактериальных клеток под влиянием различных факторов. Но сейчас уже ясно, что природа персистенции очень многообразна и выделить один или даже несколько механизмов не представляется возможным. Для некоторых бактерий выяснено, что в активно растущей популяции количество персисторов может составлять в среднем 10^{-5} клеток, что вполне достаточно для сохранения популяции в условиях воздействия антибиотиков и возобновления роста и метаболизма после исключения антибиотика. Этот факт имеет существенное клиническое значение при анализе причин возникновения хронических форм инфекционных болезней.

Представленная информация важна не только для исследователей, занимающихся проблемой антибиотикорезистентности бактерий, но и для практических бактериологов и инфекционистов, так как понимание глубинных механизмов устойчивости возбудителей дает возможность оценить многообразие связанных между собой функций отдельных

клеток и микробной популяции в целом, позволяющих сохранять жизнеспособность отдельных видов бактерий в постоянно меняющихся условиях существования в агрессивных средах в том числе создаваемых человеком.

Необходимо бы обратить внимание бактериологов на два очень полных и профессиональных обзора по данной тематике, опубликованных в последнее время: А.Г.Ткаченко. Стрессорные ответы бактериальных клеток как механизм развития толерантности к антибиотикам. Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. №2. С. 110–133; К.М.Климина, Е.У.Полуэктова, В.Н.Даниленко. Бактериальные системы токсин-анатоксин: свойства, функциональное значение, возможности использования. Там же. 2017. Т. 53. № 5. С. 449–461.

В отношении персистирующих форм бактерий, остающихся жизнеспособными в результате воздействия антибиотиками и представляющих собой форму переживания, есть некоторые соображения или сомнения, касающиеся возбудителей бактериальных особо опасных инфекций (I–II групп патогенности). Концепция дормантности подразумевает универсальный механизм (или несколько механизмов) сохранения части популяции в условиях давления антибиотика. Однако такое явление практически никогда не наблюдалось при лечении особо опасных инфекций, например, чумы, сибирской язвы, туляремии, холеры. Лечение этих инфекционных болезней всегда подразумевало полную элиминацию возбудителя из организма человека, и рецидивы заболеваний наблюдались крайне редко, а для некоторых инфекций не наблюдались вовсе. На мой взгляд, даже эти редкие случаи были связаны не с переживанием бактерий в организме, а дефектами в тактике лечения. Если бы механизм дормантности работал в данном случае, то достаточно было сохраниться в организме человека или животного бактериям в заражающей дозе (а это, например, для чумы – 2–4 микробных клетки), чего было бы достаточно для рецидива заболевания. Однако такие случаи не наблюдались при лечении людей и в многочисленных опытах на животных. Сложно предположить, что для возбудителей особо опасных и, например, госпитальных инфекций существуют разные механизмы переживания под давлением антибиотиков – у одних есть персистенция, у других нет. Этот вопрос остается открытым и нуждается в обсуждении и экспериментальном подтверждении. Проблема имеет выраженное значение для обеспечения биологической безопасности, так как возможное сохранение вирулентных клеток высококонтагиозных возбудителей в организме человека чревато эпидемиологическими осложнениями и потребует особой, ориентированной на данный эффект тактики элиминации патогена из организма.

И.А.Дятлов

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

Оценка репаративной способности, антимикробной и лимфоцитарной активности ниосомального геля в стоматологической практике

И.А.Базиков¹, А.А.Долгалева¹, А.Н.Квочко², М.А.Матюта¹, А.А.Долгалева¹

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

²ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет», Ставрополь, Российская Федерация

Высокая репаративная способность ниосомального геля «Регенерин» после хирургических вмешательств проявлялась в более ранней эпителизации (на 2–3 дня). У пациентов отмечено снижение интенсивности болевого синдрома послеоперационной раны слизистой оболочки полости рта. После обработки раны ранозаживляющим гелем «Регенерин» проведена оценка белково-синтезирующего аппарата лимфоцитов периферической крови с помощью измерения параметров ядра и активности ядрышковых организаторов (АгЯО). Установлено повышение функциональной активности лимфоцитов, проявляющееся в изменении параметров площади их ядер и средней суммарной площади АгЯО. Лимфоциты в зоне повреждения в меньшей степени реагировали на характер течения процесса репарации. Отмечено также значительное снижение резидентной и пародонтопатогенной микрофлоры в биопленке десневой борозды при лечении ниосомальным гелем «Регенерин».

Ключевые слова: кремнийорганические нановезикулы, низкомолекулярные плацентарные пептиды, регенерация, лимфоциты, биопленка

Для цитирования: Базиков И.А., Долгалева А.А., Квочко А.Н., Матюта М.А., Долгалева А.А. Оценка репаративной способности, антимикробной и лимфоцитарной активности ниосомального геля в стоматологической практике. Бактериология. 2018; 3(2): 7–11. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-7-11

Assessment of reparative ability, antimicrobial and lymphocytar activity of niosomal gel in dentistry practice

I.A.Bazikov¹, A.A.Dolgaleva¹, A.N.Kvochko², M.A.Matyuta¹, A.A.Dolgaleva¹

¹Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

²Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russian Federation

High reparative ability of the niosomal gel «Regenerin» after surgical interventions manifested earlier epithelization (for 2–3 days). Patients also noted a decrease in the intensity of the pain syndrome of the wound of the oral mucosa. The protein-synthesizing apparatus of peripheral blood lymphocytes have been evaluated by measuring the parameters of the nucleus and the activity of nucleolar organizers after processing the wound by the regenerating gel «Regenerin». An increase of the lymphocyte's functional activity was revealed, which manifests itself in a change in the parameters of their nuclei area and the average total AgЯО area. Lymphocytes in the lesion zone were less reacting to the nature of the course of the repair process. There was also a significant decrease in resident and parodontopathogenic microflora in the biofilm of the gingival groove under the treatment with the niosomal «Regenerin» gel.

Keywords: organosilicon nanovezicles, low-molecular placental peptides, regeneration, lymphocytes, biofilm, niosomes

For citation: Bazikov I.A., Dolgaleva A.A., Kvochko A.N., Matyuta M.A., Dolgaleva A.A. Assessment of reparative ability, antimicrobial and lymphocytar activity of niosomal gel in dentistry practice. Bacteriology. 2018; 3(2): 7–11. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-7-11

Для корреспонденции:

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

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310

Телефон: (8652) 35-2475

E-mail: bazikov@list.ru

Статья поступила 16.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

Igor A. Bazikov, MD, PhD, DSc, professor, head of the department of microbiology, Stavropol State Medical University

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

Phone: (8652) 35-2475

E-mail: bazikov@list.ru

The article was received 16.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

Одной из основных современных тенденций в развитии фармацевтической промышленности является разработка новых методов доставки лекарств [1]. Обычные способы пероральной или внутривенной доставки не всегда обеспечивают адекватное распределение биологически активных веществ в организме [2, 3]. Новой технологией является создание ниосомальных препаратов, полученных при инкапсулировании биологически активных веществ в ниосомах кремнийорганической природы [4–6]. Этот подход существенно меняет свойства лекарств: делает их более эффективными, влияет на способ их использования, придает им направленность и уменьшает известные побочные эффекты. Целенаправленная доставка лекарств особенно важна для применения в стоматологии [7, 8]. Нынешняя тенденция в лечении поражений слизистой оболочки полости рта и краевой пародонтальной ткани заключается в использовании гелей с регенеративным эффектом. Инкапсулированные формы, содержащие низкомолекулярные пептиды, имеют более выраженный эффект по сравнению с другими наружными средствами в стоматологической практике за счет разнонаправленного регенераторного, антимикробного и иммунного действия.

Целью исследования явилось изучение репаративной, антимикробной и лимфоцитарной активности ниосомального стоматологического геля «Регенерин» в послеоперационный период.

Материалы и методы

Проведено исследование свойств ранозаживляющего геля «Регенерин» у пациентов, находящихся на лечении в «Северо-Кавказском медицинском учебно-методическом центре». За период с января 2017 г. по январь 2018 г. гель применялся у 84 пациентов: 38 мужчин и 46 женщин в возрасте от 34 до 78 лет. В опытной группе, состоявшей из 56 пациентов, гель применяли после плановых хирургических вмешательств. В 35 случаях – после операций по установке дентальных имплантатов, в 14 случаях – после операций по направленной костной регенерации, в 7 случаях – после операций по направленной мягкотканной регенерации, у двух пациентов проводилось лечение мукозитов, развившихся на фоне химиотерапии онкологических заболеваний. В контрольной группе (26 человек) послеоперационный период проводили по стандартной схеме с использованием антисептика «Мирамистин». В зоне хирургического вмешательства во время операции, а также на 10-е, 20-е и 30-е сутки после хирургического вмешательства у пациентов отбирали образцы крови, из которых готовили мазки. Мазки окрашивали азотнокислым серебром для цитоморфологических исследований.

Окрашенные мазки исследовали с помощью светового микроскопа OLYMPUS-BX 43 (Япония). Цифровые изображения получали с помощью фотоаппарата OLYMPUS C 300 (Япония). На цифровых изображениях исследовали площадь ядра лимфоцита, количество и площадь областей ядрышковых организаторов. Морфометрические исследования проводили с использованием программы VideoTest Master 4.0 для Windows XP (АОЗТ «ИСТА», Санкт-Петербург) на IBM-совместимом компьютере, согласно рекомендациям Г.Г.Автандилова (2005).

Материалом для лабораторно-диагностических исследований служил экссудат зубодесневой борозды, полученный при обследовании пациентов, имеющих повреждения слизистой оболочки полости рта и заболевания пародонта (средний показатель индекса РМА – $12 \pm 0,9\%$), из которых были сформированы контрольная группа и две группы наблюдений. Первая группа – с повреждениями слизистой оболочки полости рта. Вторая группа – с заболеваниями пародонта. Контроль гигиенического состояния полости рта проводился с помощью гигиенического индекса.

Материалы исследования анализировали, а количественные показатели обрабатывали методом однофакторного дисперсионного анализа и двустороннего критерия Стьюдента в программе Primer of Biostatistics 4-03 для Windows. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Исследования регенеративной способности геля выявили высокую регенеративную активность при применении для эпителизации слизистой оболочки полости рта (через 10 дней после начала лечения). После хирургических вмешательств у пациентов отмечали более раннее восстановление слизистой оболочки полости рта. Интенсивность болевого синдрома была минимальной, эпителизация послеоперационной раны происходила ранее обычного на 2–3 дня. При проведении операции регенерации управляемых тканей с использованием лоскута соединительной ткани шрам, обработанный «Регенерином», формировался намного раньше, а его консистенция была намного мягче. Появление грануляционной ткани и маргинальной эпителизации происходило быстрее. Стабилизация общего состояния пациентов происходила в среднем на два дня раньше, чем у пациентов, получавших лечение без геля «Регенерин» (рис. 1, 2).

При лечении пациентов с мукозитом слизистой оболочки полости рта после химиотерапии было отмечено улучшение состояния слизистой оболочки через 5–6 дней после нанесения геля (рис. 3, 4).

При исследовании микробиологического статуса больных с повреждениями слизистых оболочек и заболеваниями пародонта после лечения гелем «Регенерин» были получены следующие результаты. Частота выявления носительства пародонтопатогенных видов у пациентов составила 37,8%, при этом у 62,2% лиц не было выявлено ни одного вида пародонтопатогенной микрофлоры (рис. 5, 6).

Число анаэробных пародонтопатогенных бактерий в биопленке зубодесневой борозды (ЗДБ) у пациентов не превышало пороговых диагностических показателей, но, по сравнению с количественными параметрами пациентов контрольной группы, увеличивалось в 1,01–1,07 раза. Наименьшее количество среди анаэробной пародонтопатогенной микрофлоры в биопленке ЗДБ составляет *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ($3,56 \pm 0,16$ lg CFU); наибольшее – *Porphyromonas gingivalis* ($4,19 \pm 0,20$ lg CFU) и *Prevotella intermedia* ($4,34 \pm 0,21$ lg CFU). В отношении резидентной микрофлоры биопленки ЗДБ отмечается разнонаправленная динамика: по отношению к количественным показателям пациентов контрольной группы минимальный прирост *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus*



Рис. 1. 1-й день после регенерации мягкой ткани.



Рис. 2. 14-й день после операции. Полное восстановление.



Рис. 3. Состояние слизистой оболочки полости рта после химиотерапии.



Рис. 4. Состояние слизистой оболочки полости рта после использования геля «Регенерин».

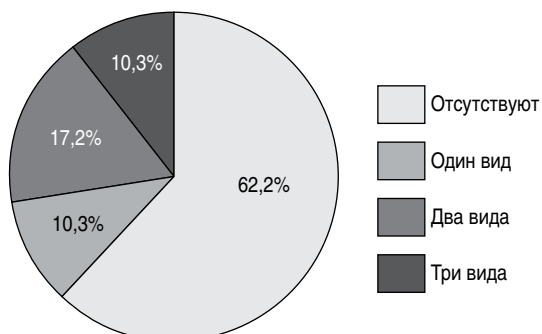


Рис. 5. Количество пародонтопатогенов в биопленке зубодесневой борозды у пациентов первой группы.

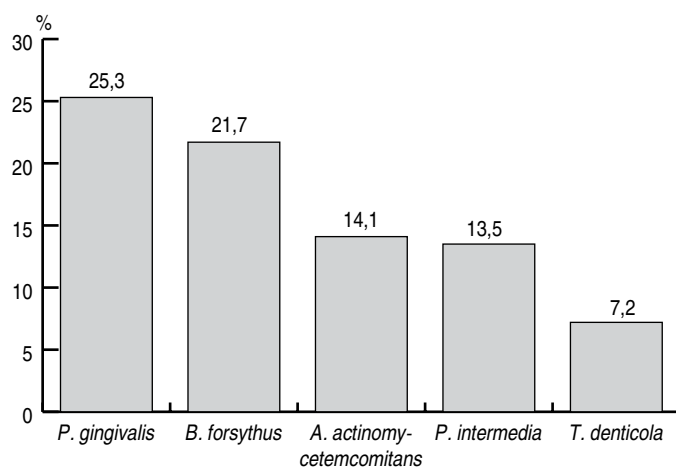


Рис. 6. Частота выявления пародонтопатогенов в биопленке зубодесневой борозды у пациентов первой группы.

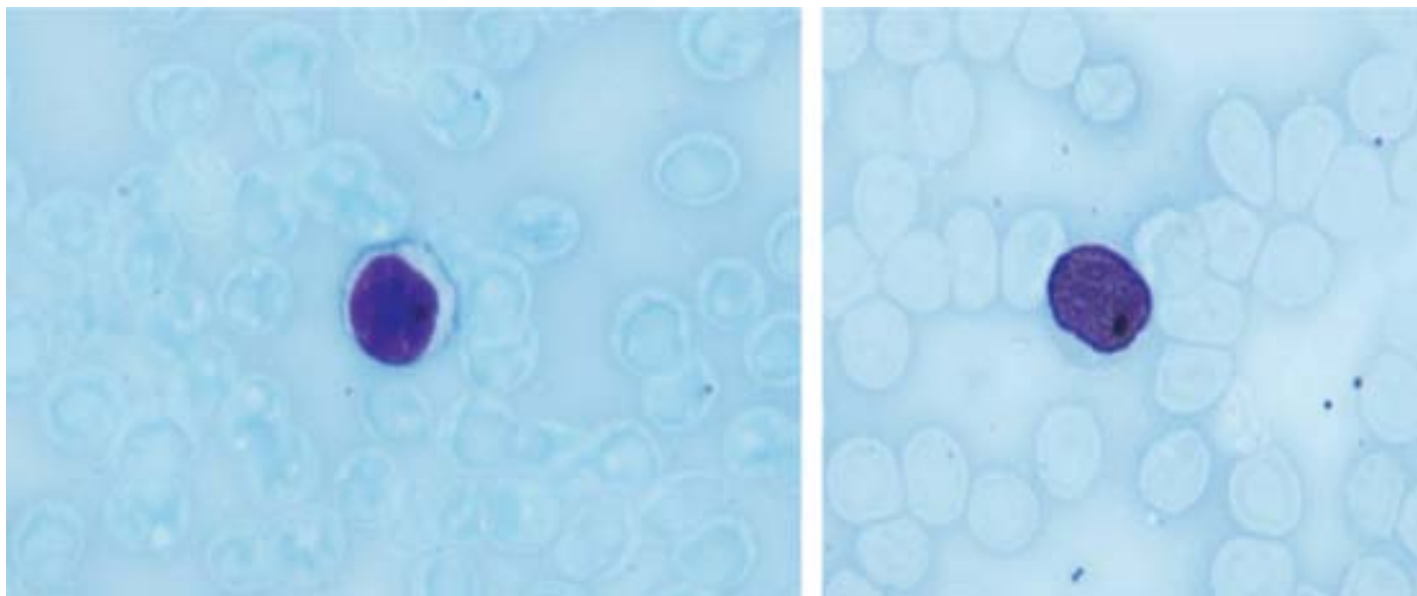


Рис. 7. Лимфоциты с аргентофильным ядрышковым организатором. Ув. ×400.

Таблица. Функциональные показатели лимфоцитов крови (n = 26)									
№ п/п	Показатель	Без регенерина (n = 13) время отбора материала				С регенерином (n = 13) время отбора материала			
		во время операции, M ± t	на 10-й день после операции, M ± t	на 20-й день после операции, M ± t	на 30-й день после операции, M ± t	во время операции, M ± t	на 10-й день после операции, M ± t	на 20-й день после операции, M ± t	на 30-й день после операции, M ± t
1	Площадь ядра лимфоцита, мкм ²	87,01 ± 2,59	94,38 ± 7,41	64,96 ± 2,79* [§]	84,48 ± 3,82*	87,01 ± 2,59	86,82 ± 2,69	113,20 ± 5,89** [§]	83,15 ± 2,86*
2	Суммарная площадь зон ядрышковых организаторов, мкм ²	2,69 ± 0,18	4,99 ± 0,49* [§]	2,40 ± 0,16*	4,13 ± 0,27* [§]	2,69 ± 0,18	3,30 ± 0,17 [#]	5,00 ± 0,43** [§]	2,25 ± 0,27**

Примечание: *различия достоверны в сравнении с предыдущим сроком исследования, $p \leq 0,05$; [#]различия достоверны между группами в аналогичный срок исследования, $p \leq 0,05$; [§]различия достоверны с дооперационными значениями, $p \leq 0,05$.

sanguis (1,03–1,04 раза) сочетается с выраженным снижением *Peptostreptococcus anaerobius* (1,44 раза) и *Veillonella parvula* (1,19 раза).

Эти данные свидетельствуют о значительном снижении резидентной и пародонтопатогенной микрофлоры в биопленке десневой борозды при лечении ниосомальным гелем «Регенерин».

Антимикробная активность ниосомальных препаратов при их местном применении на слизистой оболочке полости рта в стоматологической практике объясняется непосредственным действием самих нановезикул кремнийорганической природы. Ниосомы взаимодействуют с плазматическими мембранами микроорганизмов, увеличивая их проницаемость для низкомолекулярных веществ, что приводит к их гибели при набухании и разрывам под действием внутриклеточного осмотического давления.

В результате исследований лимфоцитарной активности выявлено, что на фиксированных и окрашенных мазках крови ядра лимфоцитов имеют свойственную для них форму. В них отчетливо просматриваются лежащие акроцентрично округлой формы АгЯО, окрашенные в темно-коричневый цвет (рис. 7).

Установлено, что средняя площадь ядра в лимфоцитах находилась в диапазоне $64,96 \pm 2,79$ – $113,20 \pm 5,89$ мкм². Она изменялась волнообразно и зависела от времени, прошедше-

го после хирургического вмешательства и применения ранозаживляющего геля «Регенерин» и без него (таблица).

Так, у пациентов, которым при обработке послеоперационной раны не применяли ранозаживляющий гель, средние значения площади ядер лимфоцитов возрастали к 10-му дню после операции на 7,81%.

Таким образом, высокая репаративная способность ниосомального геля «Регенерин» после хирургических вмешательств проявлялась в более ранней (на 2–3 дня) эпителизации. Пациенты отмечали снижение интенсивности болевого синдрома. После обработки послеоперационной раны ранозаживляющим гелем «Регенерин» установлено повышение функциональной активности лимфоцитов, проявляющееся в изменении параметров площади их ядер и средней суммарной площади АгЯО. Лимфоциты в зоне повреждения в меньшей степени реагировали на характер течения процесса репарации. При лечении ниосомальным гелем «Регенерин» отмечено также значительное снижение резидентной и пародонтопатогенной микрофлоры в биопленке десневой борозды.

Литература

1. Manconi M, Valenti D, Sinico C, Lai F, Loy G, Fadda AM. Niosomes as carriers for tretinoin. II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. *Int J Pharm.* 2003 Jul 24;260(2):261-72.

2. Yuan J, Luo Y, Gao Q. Self assembled polyion complex micelles for sustained release of hydrophilic drug. *J Microencapsul.* 2011;28(2):93-8. DOI: 10.3109/02652048.2010.534823
3. NallaDilip Reddy B., ChallaVinil Reddy, Kishore A.B. VasamMallikarjun. Formulation and in vitro Evaluvation of Erythromycin Microspheres. *Journal of Global Pharma Technology.* 2010;2:13-6.
4. Bazikov I, Maltsev A, Selimov M, Korolkova V. Using niosome to improve the effectiveness of antitumor drug. *International workshop on advanced functional nanomaterials (IWAN).* 4th edition. 22-24 March 2017.
5. Dolgalev A, Bazikov I, Zelensky V. The use of wound healing gel "Regenerin" in dental practice. In: *Proceedings of International workshop on advanced functional nanomaterials-4th edition.* 2017, ISBN No: 9789352792313. Pages 16-20.
6. Базиков ИА, Мальцев АН. Кремнийорганические ниосомы с бактерицидными и парамагнитными свойствами. Патент на изобретение RUS 2625722 от 18.07.2017.
7. Machado SRP, Evangelista RC. Development and Characterization of Cefoxitin Loaded D,LPLA Nanoparticles. *Journal of Basic and Applied Pharamaceutical Sciences.* 2010;3:193-202.
8. Tabbakhian M, Tavakoli N, Jaafari MR, Daneshamouz S. Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes: In vitro permeation and in vivo deposition studies using hamster flank and ear models. *Int J Pharm.* 2006 Oct 12; 323(1-2):1-10.

References

1. Manconi M, Valenti D, Sinico C, Lai F, Loy G, Fadda AM. Niosomes as carriers fortretinoin. II. Influence of vesicular incorporation on tretinoinphotostability. *Int J Pharm.* 2003 Jul 24;260(2):261-72.
2. Yuan J, Luo Y, Gao Q. Self assembled polyion complex micelles for sustained release of hydrophilic drug. *J Microencapsul.* 2011;28(2):93-8. DOI: 10.3109/02652048.2010.534823
3. NallaDilip Reddy B., ChallaVinil Reddy, Kishore A.B. VasamMallikarjun. Formulation and in vitro Evaluvation of Erythromycin Microspheres. *Journal of Global Pharma Technology.* 2010;2:13-6.
4. Bazikov I, Maltsev A, Selimov M, Korolkova V. Using niosome to improve the effectiveness of antitumor drug. *International workshop on advanced functional nanomaterials (IWAN).* 4th edition. 22-24 March 2017.
5. Dolgalev A, Bazikov I, Zelensky V. The use of wound healing gel "Regenerin" in dental practice. In: *Proceedings of International workshop on advanced functional nanomaterials-4th edition.* 2017, ISBN No: 9789352792313. Pages 16-20.
6. Bazikov IA, Maltsev AN. Siliconorganic niosomes with bactericidal and paramagnetic properties. Patent for invention RUS 2625722 from 18.07.2017. (In Russian).

Информация об авторах:

Долгалева Александра Александрович, доктор медицинских наук, доцент кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310
Телефон: (8652) 35-2331
E-mail: dolgalev26@mail.ru

Квачко Андрей Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующей кафедрой физиологии, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет» Адрес: 355017, Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12
Телефон: (8652) 35-2282
E-mail: kvochko@yandex.ru

Матюта Максим Алексеевич, клинический ординатор кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310
Телефон: (8652) 35-2331
E-mail: magnum26m@yandex.ru

Долгалева Александра Александровна, клинический ординатор кафедры ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310
Телефон: (8652) 35-2331
E-mail: dolgaleva@dolgalev.pro

Information about the authors:

Alexander A. Dolgalev, MD, PhD, DSc, associate professor of the department of general practition dentistry and pediatric dentistry, Stavropol State Medical University
Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 35-2331
E-mail: dolgalev26@mail.ru

Andrey N. Kvachko, MD, PhD, DSc, professor, head of the department of physiology, surgery and obstetrics, Stavropol State Agrarian University
Address: 12 per. Zootekhnikeskii, Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 35-2282
E-mail: kvochko@yandex.ru

Maxim A. Matyuta, clinical resident of the department of general practice and pediatric dentistry, state institution of stomatology, Stavropol State Medical University
Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 35-2331
E-mail: magnum26m@yandex.ru

Alexandra A. Dolgaleva, clinical resident of the department of orthopedic dentistry of the Stavropol State Medical University
Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 35-2331
E-mail: dolgaleva@dolgalev.pro

Микробиологическое обоснование выбора антибиотикотерапии при осложнениях дентальной имплантации

Л.Я.Плахтий¹, Е.И.Гатиева¹, А.Ч.Цховребов¹, Т.В.Царёва², М.С.Подпорин²

¹ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, Владикавказ, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Воспалительные осложнения дентальной имплантации представляют в последнее время одну из наиболее важных и сложных проблем стоматологии. Цель исследования: изучить видовой состав ассоциаций неспорообразующих анаэробов у больных с осложнениями дентальной имплантации и чувствительность их к антибиотикам. Определена чувствительность к антибиотикам клинических изолятов у обследованных бактериологическим методом 37 пациентов. В качестве патогенных бактерий преимущественно выделялись бактероиды, фузобактерии и актиномицеты. В 20% случаев выделяли *S. aureus*, *S. epidermidis*, включая *MRSA* и *MRSE*. Антибиотиками выбора для лечения осложнений дентальной имплантации остаются амоксициллин/клавуланат, линкозамиды (клиндамицин). Хороший результат при выборе лечения осложнений дентальной имплантации показали фторхинолоны, к которым были чувствительны неспорообразующие анаэробы. Таким образом, можно рекомендовать линкозамиды и фторхинолоны для лечения осложнений дентальной имплантации в качестве основных групп выбора.

Ключевые слова: осложнения дентальной имплантации, антибиотики, фторхинолоны

Для цитирования: Плахтий Л.Я., Гатиева Е.И., Цховребов А.Ч., Царёва Т.В., Подпорин М.С. Микробиологическое обоснование выбора антибиотикотерапии при осложнениях дентальной имплантации. Бактериология. 2018; 3(2): 12–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-12-15

Microbiological objectivation for election of antibiotic therapy in the dental implantation complication

L.Ya.Plahtiy¹, E.I.Gatieva¹, A.Ch.Tshovrebov¹, T.V.Tsareva², M.S.Podporin²

¹North-Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russian Federation;

²A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Recently, dental implantation inflammatory complications are one of the most important and challenging problems in dentistry. The goal of the research is to study the species composition of nonsporogenic anaerobe's associations in patients with complications of dental implantation and their antibiotic sensitivity. Antibiotic resistance of clinical isolates in all the examined patients (37 people) has been defined by bacteriological method. Bacteroids, fusobacterium and actinomycetes were mainly allocated as pathogenic bacteria. In 20% of cases *S. aureus*, *S. epidermidis*, including *MRSA* and *MRSE* was allocated. The antibiotics for treating dental implantation complications remain amoxicillinum/clavulonate, lincosamide (clindamicin). A good result in elect of treating dental implantation complications showed fторquinolones, which correlated with antibiotic sensitivity to these antibiotics of nonsporogenic anaerobes. Thus, one can recommend lincosamides and fторquinolones for treatment of complications dental implantation as the main selection groups.

Keywords: dental implantation complications, antibiotics, fторquinolones

For citation: Plahtiy L.Ya., Gatieva E.I., Tshovrebov A.Ch., Tsareva T.V., Podporin M.S. Microbiological objectivation for election of antibiotic therapy in the dental implantation complication. Bacteriology. 2018; 3(2): 12–15. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-12-15

Для корреспонденции:

Плахтий Людмила Яковлевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России

Адрес: 362019, Республика Северная Осетия-Алания, Владикавказ, ул. Пушкинская, 40
Телефон: (867) 253-4739
E-mail: lplahti@mail.ru

Статья поступила 18.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

Lyudmila Ya. Plahtiy, MD, PhD, DSc, professor, head of the department of microbiology, North Ossetian State Medical Academy

Address: 40 Pushkinskaya str., Vladikavkaz, 362019, Republic of North Ossetia-Alania
Phone: (867) 253-4739
E-mail: lplahti@mail.ru

The article was received 18.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

Воспалительные осложнения дентальной имплантации представляют в последнее время одну из наиболее важных и сложных проблем стоматологии. В воспалительных процессах вокруг имплантатов важную роль играет наличие микрофлоры естественных зубов с гингивитом и пародонтитом. При гингивите и пародонтите бактериальная флора с высокими вирулентными свойствами может легко колонизировать имплантаты. Наблюдения показали, что в таких случаях в тканях по периметру имплантата формируются колонии микроорганизмов или полноценные биопленки, характерные для пародонтита [1–3].

Объективно о состоянии внутрикостного зубного имплантата можно судить на основании клинического обследования, которое подтверждается микробиологическим исследованием или ПЦР-диагностикой [3–5].

Многочисленные исследования микрофлоры при заболеваниях тканей вокруг имплантата показали, что среди обычной микрофлоры по мере развития воспаления увеличивается число трепонем, грамотрицательных анаэробных бактерий [4, 6]. Облигатно-анаэробный спектр представлен преимущественно группой грамотрицательных анаэробных бактерий, включающих пародонтопатогенные виды 1 и 2 порядка. Из факультативных бактерий преобладает альфа-стрептококковая флора и, как правило, возрастает количество актиномицетов [3, 5, 7]. Это свидетельствует о незрелости и нестабильности формирующихся зубных биопленок, представляющих собой смешанную многовидовую биопленку, которую колонизируют вирулентные неспорообразующие анаэробные бактерии [2]. Среди таких патогенов, являющихся наиболее вероятными возбудителями инфекционно-воспалительных процессов в стоматологии, целый ряд микроорганизмов – *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* и ряд других бактериальных видов. Поэтому изучение свойств отдельных представителей приоритетных патогенов с оценкой их чувствительности к антибактериальным препаратам является актуальной проблемой клинической микробиологии.

Цель исследования: изучить видовой состав ассоциаций неспорообразующих анаэробов у больных с осложнениями дентальной имплантации и их чувствительность к антибиотикам.

Материалы и методы

От 37 пациентов с развившимся периимплантитом выделили 119 штаммов – представителей условно-патогенной и патогенной микробиоты полости рта. Для выделения неспорообразующих анаэробов с помощью классического бактериологического исследования в анаэробных условиях (анаэроостат «Биомерье», АнаэроHiGasPack «Биомерье», API 20A Ручной стрип для идентификации анаэробов «Биомерье», API Аналитическая таблица 20A идентификации для анаэробов «Биомерье») использовали стандартные добавки гемина и менадиона тех же производителей. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводили методом разведения стандартных доз препарата (в дисках фирмы Haimedia Labs) в жидкой питательной среде – сердечно-мозговом бульоне с геминном и

менадином. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью прикладных программ для Excel.

Результаты и обсуждение

По данным нашего исследования подтверждено существование четкой зависимости между клинической картиной периимплантита и присутствием патогенных видов микроорганизмов. В динамике приживления имплантатов в десневых карманах глубиной более 3 мм увеличивалось присутствие грамотрицательной и анаэробной микрофлоры, в том числе обнаруживались окрашенные черным пигментом бактерии, фузобактерии, вибрионы. Это свидетельствует о важности клинко-микробиологической диагностики при имплантации, тем более что установлена четкая корреляция клинических и микробиологических показателей.

При проведении бактериологических исследований у 37 пациентов с развившимся периимплантитом было выделено 106 штаммов – представителей условно-патогенной и патогенной микробиоты полости рта (табл. 1).

На долю облигатно-анаэробных бактерий приходилось 49 штаммов (46,2%), и 31 штамм был представлен микроаэрофильными альфа-зеленящими стрептококками (29,3%), преимущественно группы *S. sanguinis*/*S. mitis*. Учитывая, что для культивирования перечисленных видов необходимы условия анаэробноа, суммарно группа облигатных анаэробов с микроаэрофилами включала 80 штаммов, что составило 75,5%.

Прочие виды, соответственно, были отнесены к аэробной группе по типу дыхания – 20 штаммов, которые составили 18,9%. Причем на долю факультативно-анаэробных кокков

Таблица 1. Структура микробных ассоциаций полости рта пациентов (число пациентов – 37; число штаммов – 106)

Тип дыхания и таксономическая группа	Количество штаммов	Доля в структуре ассоциаций, %	
		Число пациентов	Частота (по числу пациентов), %
Облигатно-анаэробные бактерии	49		46,2
<i>Actinomyces</i> spp.	11		29,7
<i>Fusobacterium</i> spp.	17		45,9
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	15		40,5
<i>Porphyromonas gingivalis</i> / <i>P. asacharolyticus</i>	13		35,1
<i>Prevotella intermedia</i> / <i>P. melaninogenica</i>	18		48,7
Микроаэрофильные стрептококки	31		29,3
<i>Streptococcus sanguinis</i>	26		70,3
<i>S. mitis</i> / <i>S. oralis</i>	15		40,5
<i>S. mutans</i>	11		29,7
Факультативно-анаэробные бактерии	20		18,9
<i>Enterococcus faecium</i> / <i>E. faecalis</i>	14		37,8
<i>Staphylococcus SA/SE</i>	9		24,3
<i>Staphylococcus MRSA/MRSE</i>	5		13,5
<i>Enterobacter</i> spp.	5		13,5
<i>Klebsiella</i> spp.	3		8,1
Грибы кандиды	6		5,7
<i>Candida albicans</i>	5		13,5
<i>Candida krusei</i>	1		2,7

Таблица 2. Чувствительность приоритетных патогенов к стандартным растворам антибактериальных химиопрепаратов (частота, %)

Тест-штаммы бактерий (n)	Частота выделения чувствительных штаммов, %					
	Амоксициллин 20 мкг	Амоксициллин/ клавуланат 20 мкг	Ципрофлоксацин 5 мкг	Левоефлоксацин 5 мкг	Клиндамицин 2 мкг	Метронидазол 8 мкг
<i>Prevotella intermedia</i> (16)	75,0	87,5	81,25	100,0	81,25	68,75
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (12)	66,6	83,3	83,3	91,7	83,3	50,0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (14)	85,7	100,0	85,7	100,0	85,7	57,1
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (12)	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	75,0
<i>Streptococcus sanguinis</i> (14)	78,6	85,7	85,7	92,9	85,7	–
<i>S. aureus</i> /MRSA (6)	66,6	83,3	83,3	100,0	83,3	–
<i>S. epidermidis</i> /MRSE (5)	60,0	80,0	80,0	100,0	80,0	–

Enterococcus/Staphylococcus spp. приходились 12 штаммов (11,3%). Факультативно-анаэробные палочки из группы энтеробактерий были представлены 8 штаммами (7,6%), грибы кандиды были представлены в ассоциациях возбудителей 6 штаммами (5,7%). «Стерильных высевов», когда не выделяется ни один микроб, в нашем исследовании не было.

По частоте обнаружения приоритетных патогенов в расчете на количество пациентов, у которых они встречались (табл. 1), доминирующими видами были *Streptococcus sanguinis* (70,3%), *Prevotella intermedia*/*P. melaninogenica* (48,7%), *Fusobacterium spp.* (45,9%).

Таким образом, нами установлено, что при периимплантатах состав микрофлоры соответствовал таковому при обострении пародонтита: преимущественно выделяли представителей пигментообразующих бактериоидов, фузобактерий и пептострептококков – на долю этих возбудителей приходилась 1/2 клинических изолятов. На долю микроаэрофильных стрептококков приходилась примерно 1/3 всех изолятов (*S. sanguinis*, *S. mitis*), а на факультативно-анаэробные виды бактерий, включая энтерококки, стафилококки и энтеробактерии, – не более 1/5.

Согласно современным подходам к трактовке выделения возбудителей нозокомиальных инфекций с учетом частоты выделения и вероятной частоты обнаружения штаммов, резистентных к антибиотикам, в частности, согласно рекомендациям ВОЗ (2017 г.), к приоритетным патогенам были отнесены такие возбудители, как *Enterococcus faecium*/*E. faecalis*, *Staphylococcus SA/SE*, *Staphylococcus MRSA/MRSE*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* среди аэробных и факультативно-анаэробных видов, а также наиболее часто встречавшиеся у данной группы пациентов *Peptostreptococcus anaerobius*, *Porphyromonas gingivalis*/*P. asacharolyticus*, *Prevotella intermedia*/*P. melaninogenica*, и микроаэрофильные *Streptococcus sanguinis*/*S. mitis* – среди облигатно-анаэробных и микроаэрофильных видов.

У большей части этих штаммов была определена чувствительность к антибиотикам методом дисков. При этом было установлено, что чувствительность штаммов исследованных приоритетных патогенов к амоксициллину в большинстве случаев является неудовлетворительной и, как правило, ниже 80% штаммов чувствительны (за исключением *Peptostreptococcus anaerobius* и *Fusobacterium nucleatum*). Бета-лактамазозащищенный вариант амоксициллин/клавуланат полностью перекрывает весь спектр патогенов (с частотой выше 80%). Аналогичный результат получен нами в отношении ципрофлоксацина и клиндамицина (табл. 2).

Максимальную частоту чувствительности исследованных штаммов наблюдали в отношении левофлоксацина – более 90% чувствительных штаммов, причем *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus aureus* и *S. epidermidis* были чувствительны к левофлоксацину в 100% случаев, включая штаммы стафилококков MRSA и MRSE. Полученные нами результаты чувствительности метициллин(оксациллин)-устойчивых стафилококков к ципрофлоксацину и клиндамицину соответствуют данным Marshall S.A. [8] и дополняют их в отношении левофлоксацина.

Напротив, наибольшая частота выявления антибиотикорезистентности неспорообразующих анаэробов отмечалась к метронидазолу. Так, до 50% штаммов *Porphyromonas gingivalis* были устойчивы к этому препарату по данным фенотипического метода исследования. Полученные нами результаты согласуются с данными исследований Е.В.Ипполитова [2], который провел гено- и фенотипические исследования штаммов пародонтопатогенных бактерий, в результате чего связывает их устойчивость с наличием генетических маркеров CTX-M-2 (выявлен у 16,7% штаммов), Mec-1 и плазмидой QnrB (5,5%). Количество метициллинрезистентных штаммов у представителей оральной микрофлоры составило 11,4%, что коррелировало с выявлением генов резистентности CTX-M-2 у 16,7% штаммов. При использовании бета-лактамазозащищенных препаратов (амоксиклав) показатель резистентных штаммов снижался до 2,3%, что коррелировало с выявлением гена резистентности Mec-1 у 5,5% штаммов [9].

По мнению Царёва В.Н., наиболее часто применяемые (за последние 20–30 лет) в стоматологической практике препараты – метронидазол и линкомицин вследствие естественных процессов селекции в микробных биопленках дают высокое число устойчивых штаммов – 52,3 и 22,7% соответственно, причем чувствительных к метронидазолу штаммов определяли в 3,9 раза меньше, чем устойчивых, а для линкомицина это соотношение приближалось к 1:1 [9]. В цитируемой статье отмечается, что в зарубежных исследованиях за последние годы достаточно хорошо изучена резистентность анаэробов к метронидазолу, которую связывают с геном *Nim*.

Заключение

Таким образом, по результатам наших исследований, антибиотиками выбора для лечения осложнений дентальной имплантации остаются линкозамы (клиндамицин), бета-лактамазозащищенные пенициллины (амоксиклав), фторхи-

нолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин). Устойчивость неспорообразующих анаэробов к тому или иному антибиотику *in vitro*, определенная диско-диффузионным методом, может прогнозировать клиническую неудачу лечения [6], поэтому представленные нами данные следует использовать в практической деятельности врача-стоматолога, проводящего дентальную имплантацию или комплексное лечение генерализованного пародонтита.

Литература

1. Аванесян РА, Сирак СВ, Ходжаян АБ, Гевандова МГ, Копылова ИА. Социологические аспекты диагностики и профилактики осложнений дентальной имплантации (по данным анкетирования врачей-стоматологов). Фундаментальные исследования. 2013;7-3:495-9.
2. Ипполитов ЕВ. Мониторинг формирования микробной биопленки и оптимизация диагностики воспалительных заболеваний пародонта. Автореф. дисс. д.м.н. М., 2016, 48 с.
3. Николаева ЕН, Чувикин ВИ, Царев ВН, Панин АМ, Хитаршвили МВ, Царева ТВ. Экспрессия пародонтогенных бактерий 1 и 2 порядка у пациентов с периимплантатами. Dental Forum. 2011;4:10-2.
4. Николаева ЕН, Царев ВН, Панин АМ, и др. Исследование распространенности инфекционных агентов у пациентов с периимплантатами. Стоматология для всех. 2012;2:16-9.
5. Шашмурина ВР, Володин АИ, Царев ВН. Характеристика микробиоценоза полости рта пациентов с полным отсутствием зубов в ближайшие сроки после дентальной имплантации. Российский стоматологический журнал. 2008; 3:28-33.
6. Плахтий ЛЯ, Гатиева ЕИ, Цховребов АЧ. Влияние озонотерапии на видовой состав неспорообразующих анаэробов в процессе лечения хронического пародонтита. Стоматолог. 2012;45-8.
7. Семенников ВИ, Тейтельбаум ЮВ, Пантелеев АВ, Костюченко ЛА. Лечение и профилактика воспалительных осложнений при дентальной имплантации. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2011;4:98.
8. Marshall SA, Werner WW, Pfaller MA, Jones RN. Staphylococcus aureus and coagulase negative Staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility and molecular (mecA) characterisation of oxacillin resistance in the SCOPE Program. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 30: 205-14.
9. Tsarev VN, Ippolitov EV, Nikolaeva EN. Prevalence of genetic markers of resistance to antibiotics in biofilm-forming strains of obligate and elective anaerobes. Zh. Mikrobiol. (Moscow). 2017;2:74-80.
- periimplantitis. Stomatologiya dlya vseh (International Dental Review). 2012;2: 16-9. (In Russian).
5. Shashmurina VR, Volozhin AI, Tsaryov VN. Characterization of oral cavity microbiocenosis in totally toothless patients during the nearest post-implantation period. Rossiiskii Stomatologicheskii Zhurnal (Russian Journal of Dentistry). 2008;3:28-33. (In Russian).
6. Plakhtii LYa, Gatieva EI, Tskhovrebov ACh. Vliyanie ozonoterapii na vidovoi sostav nesporeobrazuyushchikh anaerobov v protsesse lecheniya khronicheskogo parodontita. Stomatolog. 2012;45-8. (In Russian).
7. Semennikov VI, Teitelbaum YuV, Panteleyev AV, Kostyuchenko LA. Treatment and prophylaxis of inflammatory complications after dental implantation. Bulletin of the East Siberian Scientific Center SBRAMS. 2011;4:98. (In Russian).
8. Marshall SA, Werner WW, Pfaller MA, Jones RN. Staphylococcus aureus and coagulase negative Staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility and molecular (mecA) characterisation of oxacillin resistance in the SCOPE Program. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 30: 205-14.
9. Tsarev VN, Ippolitov EV, Nikolaeva EN. Prevalence of genetic markers of resistance to antibiotics in biofilm-forming strains of obligate and elective anaerobes. Zh. Mikrobiol. (Moscow). 2017;2:74-80.

Информация о соавторах:

Гатиева Елена Ивановна, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России
Адрес: 362019, Республика Северная Осетия-Алания, Владикавказ, ул. Пушкинская, 40
Телефон: (867) 253-4739

Цховребов Алан Черменович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России
Адрес: 362019, Республика Северная Осетия-Алания, Владикавказ, ул. Пушкинская, 40
Телефон: (867) 253-9962

Царева Татьяна Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700

Подпорин Михаил Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Information about co-authors:

Elena I. Gatieva, MD, PhD, senior lecturer department of microbiology, North Ossetian State Medical Academy
Address: 40 Pushkinskaya str., Vladikavkaz, 362019, Republic of North Ossetia-Alania
Phone: (867) 253-4739

Alan Ch. Tskhovrebov, MD, PhD, associate professor of microbiology, North Ossetian State Medical Academy
Address: 40 Pushkinskaya str., Vladikavkaz, 362019, Republic of North Ossetia-Alania
Phone: (867) 253-9962

Tatyana V. Tsareva, MD, PhD, associate professor of the department of microbiology, A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700

Mikhail S. Podporin, junior reserch associate, laboratory of molecular biology investigation, Research Institute of Medicine and Dentistry of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

References

1. Avanesyan RA, Sirak SV, Khojayan AB, Gevandova MG, Kopylova IA. Sociological aspects of diagnosis and prevention of complications of dental implantation (based on survey of physicians, dentists). Fundamental Research. 2013;7-3:495-9. (In Russian).
2. Ippolitov EV. Monitoring formirovaniya mikrobnoy bioplenki i optimizatsiya diagnostiki vospalytelnykh zabolevaniy parodontita. Diss. Moscow, 2016, 48 p. (In Russian).
3. Nikolaeva EN, Tsarev VN, Panin AM, Chuvilkin VI, Khitarishvili MV, Tsareva TV. Detection of parodontopathogens (I and II orders) in patients with periimplantitis. Dental Forum. 2011;4:10-2. (In Russian).
4. Nikolaeva EN, Tsarev VN, Panin AM, Chuvilkin VI, Tsareva TV, Saykova SV, Khitarishvili MV. Prevalence study of infectious agents in patients with

Исследование антимикробной активности кумариновых субстанций в отношении *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*

А.Н.Евстропов¹, Л.Г.Бурова¹, И.В.Широких¹, А.В.Липеева², Э.Э.Шульц²

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Российская Федерация;

²ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н.Ворожцова» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация

Исследованы антимикробные свойства новых производных кумаринов на основе растительного фурукумарина пеucedанина, выделенного из *Peucedanum morisonii* Bess, в отношении *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* методом серийных разведений в жидкой питательной среде. Обнаружены антибактериальные свойства полусинтетических производных пеucedанина в отношении *S. aureus*. Большинство исследуемых субстанций проявили бактериостатические свойства. У 12 агентов обнаружены бактерицидные свойства. Наибольший интерес в дальнейшем изучении антибактериальных свойств представляют кумарины, содержащие арилалкильный заместитель в положении С-3 и производные умбеллиферона, модифицированные амидными фрагментами в положении С-6. Синтезированные димерные кумарины (3,2'-кумарин-фурукумариновые димеры) проявили меньшую активность. В отношении *P. aeruginosa* для представленных субстанций отмечена низкая антибактериальная активность: только 6 из них в высокой концентрации способны тормозить рост культуры в жидкой среде и снижать адгезивные свойства бактерий.

Ключевые слова: гетероциклические производные кумаринов, антибактериальная активность, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

Для цитирования: Евстропов А.Н., Бурова Л.Г., Широких И.В., Липеева А.В., Шульц Э.Э. Исследование антимикробной активности кумариновых субстанций в отношении *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2018; 3(2): 16–19. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-16-19

Study of the antimicrobial activity coumarin substances against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

A.N.Evstropov¹, L.G.Burova¹, I.V.Shirokih¹, A.V.Lipeeva², E.E.Shults²

¹Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation;

²Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

The antimicrobial properties of new derivatives of coumarin compounds derived from furocoumarin peucedanin (isolate from *Peucedanum morisonii* Bess), against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were investigated using the method of serial dilutions in liquid nutrient medium. Antibacterial properties of semisynthetic derivatives peucedanin against *S. aureus* have been discovered. Most of the studied substances showed bacteriostatic properties. 12 compounds possessed bactericidal properties. Coumarins containing an arylalkynyl substituent in the C-3 position and umbelliferone derivatives modified with amide fragments at the C-6 position are of the greatest interest in the further study of antibacterial properties. Synthesized dimeric coumarins (3,2'-coumarin-furocoumarin dimers) showed less activity. In the case of *P. aeruginosa*, low antibacterial activity was noted for the substances presented. Only 6 of them are able to inhibit the growth of culture in a liquid medium and reduce the adhesive properties of bacteria in high concentrations.

Keywords: heterocyclic derivatives of coumarins, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

For citation: Evstropov A.N., Burova L.G., Shirokih I.V., Lipeeva A.V., Shults E.E. Study of the antimicrobial activity coumarin substances against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriology. 2018; 3(2): 16–19. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-16-19

Для корреспонденции:

Евстропов Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Адрес: 630091, Новосибирск, Красный проспект, 52

Телефон: (383) 222-6835

E-mail: evstrop@gmail.com

Статья поступила 12.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

Alexander N. Evstropov, MD, PhD, DSc, professor, head of department of microbiology, immunology and virology, Novosibirsk State Medical University

Address: 52 Krasny Prospekt, Novosibirsk, 630091, Russian Federation

Phone: (383) 222-6835

E-mail: evstrop@gmail.com

The article was received 12.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

Несмотря на значительные достижения современной медицины, проблемы активации нозокомиальной инфекции остаются актуальными. Высокая адаптационная способность условно-патогенных микроорганизмов приводит к быстрому развитию их резистентности к антисептикам, дезинфектантам и антибиотикам, что ведет к непредсказуемости исходов осложнений у пациентов хирургического, акушерского, стоматологического, неврологического профиля, детской и гериатрической патологии, особенно при возникновении инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Большое значение в формировании резистентности к антибактериальным препаратам имеют адаптационные механизмы микробных популяций, связанные с их персистенцией и формированием микробных биопленок, в том числе на полимерных материалах медицинского назначения [1]. Такими микроорганизмами являются *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Обладая огромным арсеналом факторов патогенности, они способны повреждать различные органы и ткани человеческого организма, вызывая острые и хронические процессы, с трудом поддающиеся лечению. Золотистый стафилококк и синегнойная палочка легко приобретают устойчивость к антибактериальным препаратам, что и определяет постоянный поиск новых средств лечения вызванных ими состояний.

Особый интерес всегда представляют препараты природного происхождения, поскольку они потенциально способны обладать широким спектром проявлений биологических свойств. Производные кумарина представляют важную группу природных соединений вследствие их ценной и разнообразной биологической активности [2]. Химические модификации этих соединений привели к получению препаратов, используемых в клинической практике (антикоагулянты, антитромботические агенты). Азотсодержащие гетероциклические производные кумаринов обладают антиоксидантной, противоопухолевой и антибактериальной активностью [3, 4].

Цель работы: изучить способность производных пеucedанина ингибировать рост *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Материалы и методы

В работе были исследованы новые производные кумаринов на основе растительного фурукумарина пеucedанина, синтезированные в лаборатории медицинской химии Новосибирского института органической химии им. Н.Н.Ворожцова СО РАН. Природный кумарин горичника Морисона (*Peucedanum morisonii* Bess) – пеурутеницин получали из пеucedанина по ранее описанной методике [5]. На основе пеурутеницина синтезировали 2 типа замещенных кумаринов – по положениям С-3 и С-6 кумаринового остова. Субстанциям присвоены коды L-*. Замещенные по положению С-3 кумарины: 3-бромпеурутеницин L-520, 3-алкинилзамещенные умбеллифероны L-3, L-521, L-524, L-525, а также 3,2'-дикумарины (L-505-2, L-505-3, L-505-8, L-510 и L-511, содержащие фрагменты растительных кумаринов пеурутеницина и ореозелона, соединенные триазолильным линкером). Кумарины с азотсодержащими заместителями в положении

С-6 (L-512, L-512-3, L-512-3 и L-512-5) синтезировали из умбеллиферон-6-карбоновой кислоты, полученной гидролизом пеурутеницина.

Антибактериальную активность изучали методом серийных разведений в жидкой питательной среде [6]. Все субстанции первично растворяли в 0,05 мл 96% этилового спирта и доводили до нужной концентрации 0,9% раствором хлорида натрия. Дозы веществ выше 1000 мкг/мл не рассматривались ввиду их малой растворимости. В качестве тест-культур брали *Staphylococcus aureus* 209 и *Pseudomonas aeruginosa* Y-17. Посевную дозу суточных культур бактерий определяли с использованием стандарта мутности по Mc Farland и контролировали высевом на плотную питательную среду с дальнейшим подсчетом количества колониеобразующих единиц (КОЕ). Определяли минимальную ингибирующую (бактериостатическую) концентрацию (МИК) и минимальную бактерицидную концентрацию (МБК).

Торможение препаратами адгезивной активности *P. aeruginosa* определяли при моделировании пленкообразования на поверхности поливинилхлоридного фрагмента эндотрахеальной трубки общей площадью $2,21 \pm 0,08$ см, помещенного в 2 мл питательного бульона. Через 24 ч инкубации фрагменты извлекали, отмывали физиологическим раствором и инкубировали 10 мин в 0,02% растворе натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, после чего производили высеv на питательный агар. Далее подсчитывали количество колоний [7, 8].

Результаты обрабатывали с использованием программы Biostatistics [9]. Определяли средние значения показателей и стандартную ошибку.

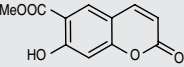
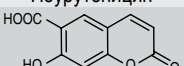
Результаты и обсуждение

Было обнаружено, что при внесении суточной культуры стафилококка в средней дозе $371,8 \pm 72,89$ КОЕ/0,1 мл пеурутеницин не проявлял антибактериальных свойств в заданных условиях (табл. 1). Вещества L-510, L-511, L-512-5 обладали бактериостатическим действием и тормозили рост культуры в концентрации 1000 мкг/мл до $(5,4 \pm 0,18) \times 10^3$, $(1,3 \pm 0,1) \times 10^5$ и $(1,62 \pm 0,03) \times 10^5$ КОЕ/мл соответственно. МБК не уточнялась.

Умбеллиферон-6-карбоновая кислота полностью подавляла рост бактерий в концентрации 1000 мкг/мл и сдерживала его в концентрации 500 мкг/мл до $(3,1 \pm 0,29) \times 10^4$ КОЕ/мл при сплошном росте в контроле.

Субстанция L-3 сдерживала рост стафилококка в концентрации 250 мкг/мл до $(3,3 \pm 0,25) \times 10^3$ КОЕ/мл и оказывала бактерицидное действие в концентрации 750 мкг/мл. Препараты L-505-3, L-512-4 и L-524 показали сходные свойства. МБК была равна 500 мкг, а МИК – 250 мкг, при подавлении роста стафилококковой культуры до $(2,9 \pm 0,27) \times 10^4$, $(1,5 \pm 0,22) \times 10^3$ и $(3,6 \pm 0,18) \times 10^4$ соответственно. Вещества L-505-8, L-521 и L-520 имели показатели МБК, равные 250, 200 и 100 мкг/мл соответственно, тогда как значения МИК для них составили 175 мкг/мл при подавлении роста культуры до $(3,1 \pm 0,15) \times 10^3$, 75 мкг/мл – до $(4,4 \pm 0,43) \times 10^4$ и 75 мкг/мл – до $(6,4 \pm 0,80) \times 10^4$ КОЕ/мл соответственно.

Таблица 1. Антибактериальные свойства препаратов пеуцеданина в отношении *S. aureus*

№ п/п	Субстанции	МБК, мкг	МИК	
			значение, мкг	количество, КОЕ/мл
1.	 Пеурутеницин	Более 1000	Более 1000	Сплошной рост
2.	 Умбеллиферон-6-карбоновая кислота	1000	500	$(3,1 \pm 0,29) \times 10^4$
3.	L-3	750	250	$(3,3 \pm 0,25) \times 10^3$
4.	L-505-2	50	25	$(6,6 \pm 0,36) \times 10^4$
5.	L-505-3	500	250	$(2,9 \pm 0,27) \times 10^4$
6.	L-505-8	250	175	$(3,1 \pm 0,15) \times 10^3$
7.	L-510	Более 1000	1000	$(5,4 \pm 0,18) \times 10^3$
8.	L-511	Более 1000	1000	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^5$
9.	L-512	0,1	0,01	$(1,9 \pm 0,4) \times 10^3$
10.	L-512-3	0,125	0,1	$(4,6 \pm 0,89) \times 10^4$
11.	L-512-4	500	250	$(1,5 \pm 0,22) \times 10^3$
12.	L-512-5	Более 1000	1000	$(1,62 \pm 0,03) \times 10^5$
13.	L-520	100	75	$(6,4 \pm 0,80) \times 10^4$
14.	L-521	200	75	$(4,4 \pm 0,43) \times 10^4$
15.	L-524	500	250	$(3,6 \pm 0,18) \times 10^4$
16.	L-525	0,62	0,1	$(6,9 \pm 0,36) \times 10^4$

Для субстанции L-505-2 значение МБК оказалось равным 50 мкг/мл, а МИК составила 25 мкг/мл при подавлении роста золотистого стафилококка до $(6,6 \pm 0,36) \times 10^4$ КОЕ/мл по сравнению со сплошным ростом в контроле.

Наибольшую активность в заданных условиях показали вещества L-525, имеющий ароматический заместитель по 3 положению пиринового кольца, L-512-3 и L-512, имеющие заместитель в 7 положении бензольного кольца. Значения МБК для них составили 0,62 мкг/мл, 0,125 мкг/мл и 0,1 мкг/мл соответственно. Препараты L-525 и L-512-3 в концентрации 0,1 мкг/мл подавляли рост бактерий до $(6,9 \pm 0,36) \times 10^4$ КОЕ/мл и $(4,6 \pm 0,89) \times 10^4$ КОЕ/мл. Для субстанции L-512 выявлено бактериостатическое действие в дозе 0,01 мкг/мл при снижении роста стафилококка до $(1,9 \pm 0,4) \times 10^3$ КОЕ/мл.

Антибактериальные свойства в отношении *P. aeruginosa* субстанции проявили намного слабее.

При внесении бактериальной культуры в дозе 360 $\pm$ 43,01 КОЕ только вещество L-525 проявило бактерицидный эффект в концентрации 750 мкг/мл, тормозя адгезию бактерий в концентрации 500 мкг/мл до $(1,00 \pm 0,14) \times 10^5$ КОЕ/см. Субстанции L-505-2, L-505-8 и L-505-8 в минимальной ингибирующей концентрации 500 мкг/мл тормозили рост тест-культуры в жидкой питательной среде до $(8,6 \pm 0,35) \times 10^5$, $(8,0 \pm 0,41) \times 10^5$ и $(5,7 \pm 0,13) \times 10^5$ КОЕ/мл соответственно (табл. 2); а также снижали адгезивную активность бактерий соответственно до $(3,00 \pm 0,34) \times 10^5$, $(2,70 \pm 0,06) \times 10^5$ и $(3,05 \pm 0,06) \times 10^5$ КОЕ/см. Для веществ L-521 и L-512 удалось установить эффект снижения потенциальной способности синегнойной палочки образовывать пленку на поливинилхлоридной поверхности до $(4,80 \pm 0,09) \times 10^5$ и $(5,89 \pm 0,19) \times 10^5$ КОЕ/см.

Таким образом, обнаружены антибактериальные свойства полусинтетических производных кумарина – пеуцеданина в отношении *S. aureus*. Большинство исследуемых субстан-

Таблица 2. Бактериостатическое действие производных пеуцеданина в отношении *P. aeruginosa*

Субстанции, 500 мкг/мл	Рост в питательном бульоне, КОЕ/мл	Колонизация поливинилхлоридного фрагмента, КОЕ/см
L-505-2	$(8,6 \pm 0,35) \times 10^5$	$(3,00 \pm 0,34) \times 10^5$
L-505-8	$(8,0 \pm 0,41) \times 10^5$	$(2,70 \pm 0,06) \times 10^5$
L-505-8	$(5,7 \pm 0,13) \times 10^5$	$(3,05 \pm 0,06) \times 10^5$
L-521	Сплошной рост	$(4,80 \pm 0,09) \times 10^5$
L-512	Сплошной рост	$(5,89 \pm 0,19) \times 10^5$

ций проявили бактериостатические свойства. У 12 препаратов обнаружены бактерицидные свойства.

Наибольший интерес в дальнейшем изучении антибактериальных свойств представляют вещества L-525, L-512-3 и L-512 – кумарины, содержащие арилалкинильный заместитель в положении С-3 (L-525) и производные умбеллиферона, модифицированные амидными фрагментами в положении С-6. Синтезированные димерные кумарины (3,2'-кумаринфурукумариновые димеры) L-505-2, L-505-3, L-505-8 проявили меньшую активность.

В отношении *P. aeruginosa* для представленных субстанций отмечена низкая антибактериальная активность: только 6 из них в высокой концентрации способны тормозить рост культуры в жидкой среде и снижать адгезивные свойства бактерий.

Информация о финансировании

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ №18-03-01012 и РНФ № 17-73-10099.

Литература

- Диденко ЛВ, Автандилов ГА, Ипполитов ЕВ, Царева ЕВ, Смирнова ТА, Шевлягина НВ, Царев ВН. Формирование биопленок на стоматологических полимерных материалах как основа персистенции микроорганизмов при патологии зубов и пародонта. Эндодонтия Today. 2015;4:13-17.
- Barot KP, Barot KP, Jain SV, Kremer L, Singh S, Ghate MD. Recent advances and therapeutic journey of coumarins: current status and perspectives. Med Chem Res. 2015;24:2771-98.
- Pérez-Cruz F, Vazquez-Rodriguez S, Matos MJ, Herrera-Morales A, Villamena FA, Das A, et al. Synthesis and Electrochemical and Biological Studies of Novel Coumarin-Chalcone Hybrid Compounds. J Med Chem. 2013 Aug 8;56(15):6136-45. DOI: 10.1021/jm400546y
- Yusufzai SK, Osman H, Khan MS, Mohamad S, Sulaiman O, Parumasivam T, et al. Design, characterization, in vitro antibacterial, antitubercular evaluation and structure-activity relationships of new hydrazinyl thiazolyl coumarin derivatives. Med Chem Res. 2017;26:1139-48.
- Осадчий СА, Шульц ЭЭ, Шакиров ММ, Толстиков ГА. Превращения растительных кумаринов. 1. Трансформации пеуцеданина. Известия Академии наук, серия хим. 2006;375-9.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н.Миронова. М.: Гриф и К, 2012, 944 с.
- Мележик ИА, Яворская НВ, Шепелевич ВВ, Козозей ВН. Роль биопленок *Pseudomonas aeruginosa* в развитии эндогенных инфекций. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2013;3:2-29.
- Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implantrelated infections by antibioticcoated implants: a review. Injury. 2006 May;37 Suppl 2:S105-12. DOI: 10.1016/j.injury.2006.04.016

9. Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz. Windows Implementation by Rich Goldstein, Steve Solomon, Copyring 1998. Mc Graw Hill

References

1. Didenko LV, Avtandilov GA, Ippolitov EV, Tsareva EV, Smirnova TA, Shevlyagina NV, Tsarev VN. Formation of biofilms on dental polymer materials as the basis for the persistence of microorganisms in the pathology of the teeth and periodontal. Endodontology Today. 2015;4:13-17. (In Russian).
2. Barot KP, Barot KP, Jain SV, Kremer L, Singh S, Ghate MD. Recent advances and therapeutic journey of coumarins: current status and perspectives. Med Chem Res. 2015;24:2771-98.
3. Pérez-Cruz F, Vazquez-Rodriguez S, Matos MJ, Herrera-Morales A, Villamena FA, Das A, et al. Synthesis and Electrochemical and Biological Studies of Novel Coumarin–Chalcone Hybrid Compounds. J Med Chem. 2013 Aug 8;56(15):6136-45. DOI: 10.1021/jm400546y
4. Yusufzai SK, Osman H, Khan MS, Mohamad S, Sulaiman O, Parumasivam T, et al. Design, characterization, in vitro antibacterial, antitubercular evaluation and structure–activity relationships of new hydrazinyl thiazolyl coumarin derivatives. Med Chem Res. 2017;26:1139-48.
5. Osadchii SA, Shul'ts EE, Shakirov MM, Tolstikov GA. Transformations of peucedanin. Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR. Division of Chemical Sciences. 2006;375-9. (In Russian).
6. The guidelines for preclinical studies of pharmaceuticals. Part I. Edited by A.N. Mironov. Moscow: "Grif and K" Publ., 2012, 944 p. (In Russian).
7. Melezhik IA, Yavorskaya NV, Shepelevich VV, Kokozay VN The role of biofilm in pseudomonas aeruginosa endogenous infections. Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN. 2013;3:2-29 (<http://www.elmag.uran.ru>). (In Russian).
8. Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. Injury. 2006 May;37 Suppl 2:S105-12. DOI: 10.1016/j.injury.2006.04.016
9. Primer of Biostatistics Version 4.03 by Stanton A. Glantz. Windows Implementation by Rich Goldstein, Steve Solomon, Copyring 1998. Mc Graw Hill

Информация об авторах:

Бурова Любовь Георгиевна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
Адрес: 630091, Новосибирск, Красный проспект, 52
Телефон: (383) 222-6835
E-mail: mic.bio.lgb@mail.ru

Широких Илья Валерьевич, студент четвертого курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
Адрес: 630091, Новосибирск, Красный проспект, 52
Телефон: (383) 222-6835
E-mail: shir413@mail.ru

Липеева Алла Викторовна, научный сотрудник лаборатории медицинской химии ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н.Ворожцова» СО РАН
Адрес: 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 9
Телефон: (383) 330-8533
E-mail: mond@nioch.nsc.ru

Шульц Эльвира Эдуардовна, доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией медицинской химии ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н.Ворожцова» СО РАН
Адрес: 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 9
Телефон: (383) 330-8533
E-mail: schultz@nioch.nsc.ru

Information about the authors:

Liubov G. Burova, MD, PhD, assistant of department of microbiology, virology and immunology, Novosibirsk State Medical University
Address: 52 Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russian Federation
Phone: (383) 222-6835
E-mail: mic.bio.lgb@mail.ru

Ilya V. Shirokikh, third-year student of the medical faculty, Novosibirsk State Medical University
Address: 52 Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russian Federation
Phone: (383) 222-6835
E-mail: shir413@mail.ru

Alla V. Lipeeva, researcher of laboratory of medicinal chemistry, Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences
Address: NIOCH SB RAS, 9 Lavrentiev Avenue, Novosibirsk, 630090, Russian Federation
Phone: (383) 330-8533
E-mail: mond@nioch.nsc.ru

Elvira E. Shults, Dr of Chemical Sci professor, head of laboratory of medicinal chemistry, Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences
Address: NIOCH SB RAS, 9 Lavrentiev Avenue, Novosibirsk, 630090, Russian Federation
Phone: (383) 330-8533
E-mail: schultz@nioch.nsc.ru

НОВОСТИ НАУКИ

Новости о вакцине против болезни Лайма

В обновлении о прогрессе Компания Valneva заявила, что они успешно завершили процесс первой фазы испытаний кандидата в вакцину против болезни Лайма VLA15 и получили согласование в отношении своей стратегии на фазу 2. Вакцина-кандидат VLA15 в настоящее время является единственной активной вакцинной программой в клинических разработках против болезни Лайма.

VLA15 представляет собой поливалентную, белково-субъединичную вакцину, которая нацелена на наружный поверхностный белок A (OspA) *Borrelia*. Она предназначена для профилактической, активной иммунизации против болезни Лайма, направленной на защиту от большинства патогенных для человека видов *Borrelia*. VLA15 предназначена для обеспечения защиты путем повышения уровня антител, которые препятствуют миграции *Borrelia* от клещей к людям после укуса.

Целевая группа населения включает людей старше 2 лет, живущих в эндемичных районах либо планирующих поездку в эндемичные районы, а также людей, которые имеют историю болезни Лайма (поскольку инфекция *Borrelia* не защищает иммунитет против всех патогенных видов *Borrelia*).

Lyme disease vaccine update: «Significant progress» being made – Outbreak News Today [WWW Document], n.d.
URL <http://outbreaknewstoday.com/lyme-disease-vaccine-update-significant-progress-made-31443/> (accessed 7.19.18).

Применение экспресс-метода лазерной флуоресцентной спектроскопии для определения чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам

Е.В.Ипполитов, Д.В.Давыдов, В.В.Царёва, А.А.Лабазанов, М.С.Подпорин

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

Цель. Сравнительный анализ эффективности экспресс-метода лазерно-флуоресцентной спектроскопии (ЛФС) для определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

Материалы и методы. Проводили исследование чувствительности микрофлоры гнойного отделяемого, полученного при заболеваниях слезных путей (дакриоцистит, конъюнктивит), – 16 образцов, из пазух носа (верхнечелюстной синусит) – 18 образцов, с помощью метода ЛФС, а также традиционного бактериологического исследования с использованием техники анаэробного культивирования для сравнения.

Результаты и выводы. Установлены существенные различия мощности флуоресценции в зависимости от чувствительности/резистентности штаммов к антибиотикам. Полученные результаты позволяют рекомендовать врачам-офтальмологам, стоматологам, оториноларингологам назначение препарата, в пробе с которым наблюдается максимальное снижение флуоресценции по сравнению с контролем. Предложенный экспресс-тест позволяет практикующему врачу избежать эмпирического выбора средств медикаментозной поддержки.

Ключевые слова: чувствительность/резистентность к антибиотикам, штаммы, лазерно-флуоресцентная спектроскопия

Для цитирования: Ипполитов Е.В., Давыдов Д.В., Царёва В.В., Лабазанов А.А., Подпорин М.С. Применение экспресс-метода лазерной флуоресцентной спектроскопии для определения чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам. Бактериология. 2018; 3(2): 20–23. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-20-23

Application of the rapid method of laser fluorescence spectroscopy to determine the sensitivity of pathogens to antibacterial drugs

E.V.Ippolitov, D.V.Davidov, V.V.Tsareva, A.A.Labazanov, M.S.Podporin

A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

The aim of the work is a comparative analysis of the effectiveness of the express method of laser-fluorescence spectroscopy to determine the sensitivity of bacteria to antibiotics.

Materials and methods. The sensitivity of the purulent discharge microflora, obtained in diseases of the lacrimal tract (dacryocystitis, conjunctivitis) – 16 samples, from the sinuses (maxillary sinusitis) – 18 samples, using the method of laser-fluorescence spectroscopy, as well as traditional bacteriological study using anaerobic cultivation techniques for comparison, was studied.

Results and conclusions. Significant differences in fluorescence power were found depending on the sensitivity/resistance of strains to antibiotics. The results obtained allow to recommend to ophthalmologists, dentists, otorhinolaryngologists the appointment of the drug, in the sample with which there is a maximum decrease in fluorescence, compared with the control. The proposed rapid test allows the practitioner to avoid the empirical choice of medical support,

Keywords: antibiotic sensitivity/resistance, strains, laser-fluorescence spectroscopy

For citation: Ippolitov E.V., Davidov D.V., Tsareva V.V., Labazanov A.A., Podporin M.S. Application of the rapid method of laser fluorescence spectroscopy to determine the sensitivity of pathogens to antibacterial drugs. Bacteriology. 2018; 3(2): 20–23. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-20-23

Для корреспонденции:

Ипполитов Евгений Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России

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

Телефон: (495) 609-6700

E-mail: ippo@bk.ru

Статья поступила 15.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

Yevgeniy V. Ippolitov, MD, PhD, DSc, professor, head of department of microbiology, virology, immunology of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation

Phone: (495) 609-6700

E-mail: ippo@bk.ru

The article was received 15.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

В меморандуме «Глобальная стратегия по сдерживанию антимикробной резистентности», принятом Всемирной организацией здравоохранения в 2001 г., прогрессирующее развитие устойчивости возбудителей оппортунистических и особенно ятрогенных инфекций к антибиотикам на всех континентах рассматривается как угроза национальной безопасности государств [1, 2].

Российская Федерация участвовала в формировании нового Глобального плана преодоления антимикробной резистентности. Обсуждение этого документа во Всемирной организации здравоохранения состоялось в 2015 г., и уже в сентябре 2016 г. ВОЗ на 71-й сессии Генеральной ассамблеи ООН призвала правительства всех стран мира разработать план борьбы с распространением устойчивости микроорганизмов к антибиотикам [3].

В октябре 2017 г. Председатель Правительства Российской Федерации Д.А.Медведев подписал распоряжение об утверждении «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 года», представленной Минздравом РФ. Российская национальная стратегия включила в себя все основные положения Глобального плана преодоления антимикробной резистентности. Отечественная стратегия межведомственная – в ее разработке, помимо Минздрава, участвовали Роспотребнадзор, Минфин, Минпромторг, Минсельхоз, Россельхознадзор, МЭР, ФАНО и РАН.

Стратегию планируется реализовать в два этапа. Первый (до 2020 года) предусматривает повышение осведомленности населения о рациональном применении противомикробных препаратов, недопустимости самолечения, а также увеличение охвата пропагандой иммунопрофилактики и здорового образа жизни. На этом этапе также планируется повысить выявляемость резистентности к противомикробным препаратам, а также установить базовые показатели, характеризующие распространенность антимикробной резистентности. На втором этапе (до 2030 г.) планируется сократить количество случаев оказания медицинской помощи при инфекционных заболеваниях, вызванных микроорганизмами со множественной лекарственной устойчивостью.

Однако известно, что существующие методы определения чувствительности/резистентности к антибактериальным препаратам имеют ряд недостатков, среди которых следует отметить, прежде всего, отсутствие надежного экспресс-метода и частый процент несовпадения результатов определения чувствительности/эффективности препарата в клинической практике, что в настоящее время связывают с формированием микробных биопленок в воспалительном очаге и покоящихся форм бактерий-персистеров, находящихся в состоянии анабиоза или минимизированного метаболизма [1, 3, 4].

Цель исследования: повышение эффективности диагностики оппортунистической инфекции в клиническом материале от пациентов стоматологического и офтальмологического профиля путем апробации экспресс-методики выявления и оценки чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам методом лазерной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС).

Материалы и методы

Проводили исследование чувствительности микрофлоры гнойного отделяемого, полученного при заболеваниях слезных путей (дакриоцистит, конъюнктивит) – 16 образцов и пазух носа (верхнечелюстной синусит) – 18 образцов с помощью метода ЛФС [5], а также традиционного бактериологического исследования с использованием техники анаэробного культивирования для сравнения [6]. В качестве моделей для эксперимента использовали 4 препарата: ампициллина гидрохлорид, гентамицина сульфат, линкомицина гидрохлорид, цiproфлоксацин, метронидазол. Проведено 4 серии экспериментов в 5 повторностях.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критериев Манна–Уитни и корреляции по Спирмену.

Результаты и обсуждение

Оценку результатов, полученных методом ЛФС, проводили исходя из положения, высказанного М.Т.Александровым и А.А.Воробьевым, что уменьшение мощности флуоресценции в динамике адекватно уменьшению концентрации микроорганизмов, а ее увеличение – наоборот (увеличению концентрации и метаболической активности микрофлоры) [5].

При оценке кривых роста микробных популяций в микст-культурах было установлено, что мощность флуоресценции гнойного отделяемого отражает густоту микробной взвеси в пробирках, а при добавлении к исследуемому материалу разных антибиотиков и кратковременном культивировании (в течение 12 ч) мощность флуоресценции существенно меняется в зависимости от чувствительности компонентов консорциума. Иными словами, она падает при чувствительности компонентов консорциума к тестируемому антибактериальному препарату и, напротив, возрастает при резистентности штаммов.

В первой серии экспериментов выявлены резкое снижение мутности бактериальной взвеси с ампициллином в концентрации 4 мкг/мл и 2 мкг/мл в первые 60 мин по сравнению с мутностью контроля культуры и отсутствие изменений мощности флуоресценции взвеси с ампициллином в концентрациях 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл. Примерно та же картина наблюдалась также и через 12 ч. Учет результатов бактериологического исследования (высев на 5% кровяной агар с гемом) через 24 ч показал отсутствие роста в пробирках с ампициллином в концентрациях 4 мкг/мл и 2 мкг/мл и рост культуры в пробирках с ампициллином в концентрациях 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, что подтвердило результат, полученный методом ЛФС в первые 60 мин.

Во второй серии экспериментов при проведении клинико-лабораторного исследования гнойного экссудата выявлены резкое снижение мутности бактериальной взвеси с цiproфлоксацином в концентрации 4 мкг/мл, 2 мкг/мл и 1 мкг/мл (в первые 60 мин) по сравнению с мутностью контроля культуры и отсутствие изменений мощности флуоресценции взвеси с цiproфлоксацином в концентрациях 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл. Контрольный посев, сделанный из обработанной пробы в это время (через 60 минут),

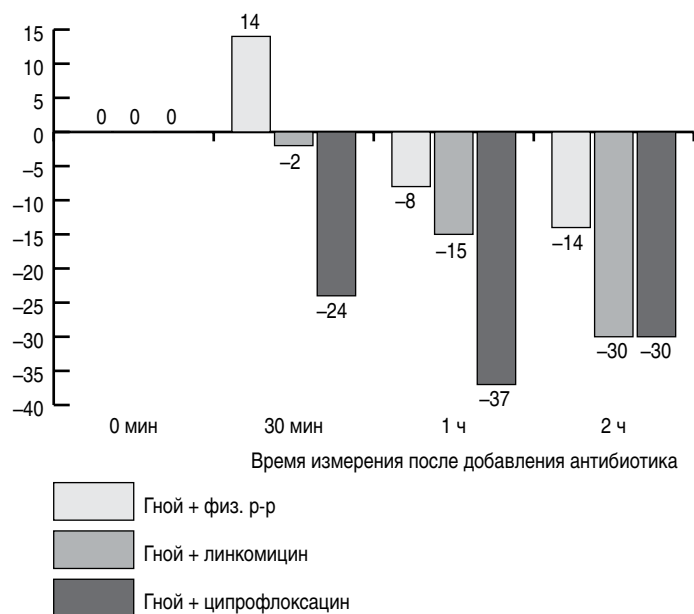


Рис. 1. Исследование действия линкомицина и ципрофлоксацина на микрофлору гнойного отделяемого раны больной В. в динамике эксперимента ЛФС.

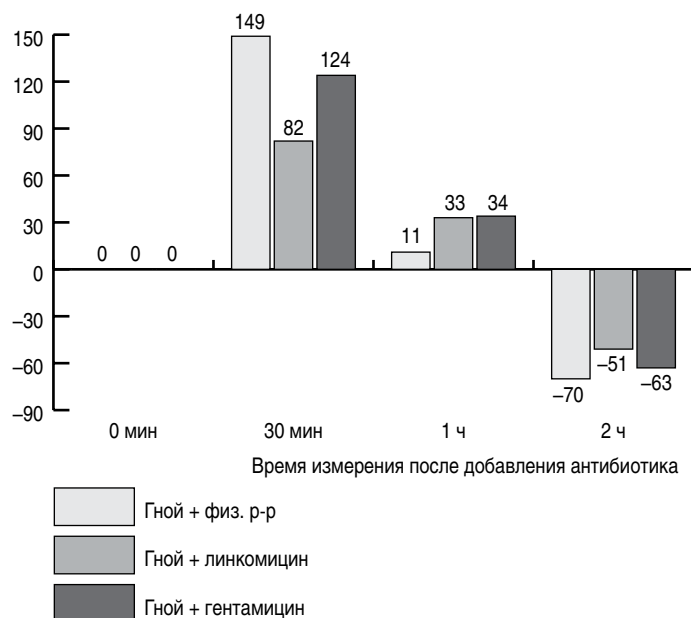


Рис. 2. Исследование действия гентамицина и линкомицина на микрофлору гнойного отделяемого раны больного Г. в динамике эксперимента ЛФС.

также показал отсутствие роста при культивировании через 24 ч в пробах с ципрофлоксацином в концентрациях 4 мкг/мл и 2 мкг/мл.

Таким образом, результаты культурального исследования подтвердили данные, полученные методом ЛФС.

Наибольшая чувствительность смешанной микрофлоры гнойного отделяемого определяется к ципрофлоксацину (больная В.) – это видно по выраженному снижению мощности флюоресценции через 30 мин и 1 ч после постановки пробы, в то время как линкомицина гидрохлорид оказывал эффект (причем менее выраженный) лишь через 2 ч (рис. 1).

В третьей серии экспериментов с использованием гентамицина сульфата и линкомицина гидрохлорида получен пример отсутствия чувствительности микрофлоры гнойного отделяемого к препаратам, так как в исследуемой пробе не происходило снижения флюоресценции, отличного от контроля. На рисунке 2 представлен пример отсутствия чувствительности микрофлоры гнойной раны больного (больной Г.) к используемым антибиотикам, так как в исследуемой пробе не происходило снижения флюоресценции гнойного отделяемого с антибиотиком, отличного от контроля.

При высеве через 24 ч выделена чистая культура *Enterococcus faecalis*, устойчивого к гентамицину, в ассоциации с анаэробным возбудителем из группы пигментообразующих бактероидов – *Prevotella melaninogenica*. Как известно, облигатно-анаэробные виды, как правило, обладают природной (естественной) устойчивостью к аминогликозидам, что необходимо учитывать при назначении антибактериальной терапии [1, 3, 6].

Для объективности полученных результатов в следующей серии экспериментов мы провели сравнительное изучение метода серийных двукратных разведений (бактериологический метод) и метода ЛФС для определения

чувствительности микробов к антимикробным препаратам с целью изучения зависимости бактериостатического или бактерицидного действия антибиотиков от концентрации бактерий.

С использованием референс-штамма *S. aureus* было установлено, что при концентрации микробной взвеси 10^6 КОЕ/мл антибиотик (например, ампициллина гидрохлорид) подавляет рост бактерий полностью (на 100%), а при концентрации 10^8 КОЕ/мл – только на 70%, при 10^{10} КОЕ/мл – на 30%. При использовании в эксперименте гентамицина сульфата и ципрофлоксацина получены сходные результаты (100% – 75% – 30% и 100% – 75% – 50% соответственно). Очевидно, что только 100% эффект подавления роста культуры может быть охарактеризован как бактерицидный.

Данные последних исследований свидетельствуют, что в исследуемой популяции количество как антибиотикочувствительных, так и антибиотикорезистентных штаммов микробов, выделяемых из гнойного экссудата у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области, сбалансировано и практически одинаково. Но в то же время разные штаммы, выделенные у разных пациентов и относящиеся к одному и тому же виду микроорганизмов, могут быть как чувствительными, так и резистентными к антибактериальным препаратам [2, 7].

Выявленные нами различия в показателях мощности флюоресценции позволяют рекомендовать клиницистам врачам-офтальмологам, стоматологам, оториноларингологам назначение того препарата, в пробе с которым наблюдается максимальное снижение флюоресценции по сравнению с контролем. Предложенный экспресс-тест позволяет практикующему врачу избежать эмпирического выбора средств медикаментозной поддержки, особенно до получения результатов бактериологического исследования (длительность исследования с определением чувствительности к антимикробным препаратам – 5–7 дней).

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости коррекции медикаментозного воздействия на гнойную рану в зависимости от концентрации бактерий (что зачастую не учитывается практикующими врачами вследствие отсутствия клинических технологий экспресс-определения концентрации и чувствительности микробиоты гнойной раны непосредственно в месте лечения). Данный факт позволяет, на наш взгляд, объяснить низкую эффективность антибактериальной терапии гнойной инфекции при выявленной высокой чувствительности микрофлоры гнойной раны к антибиотику, а также отсутствие таковой в реальной клинической практике вследствие значительной – 10^8 КОЕ/мл и более концентрации микробов в гнойной ране. В этих случаях необходимость применения ЛФС в качестве экспресс-метода лабораторной диагностики становится еще более очевидной. Метод ЛФС на сегодняшний день можно охарактеризовать как клинкоориентированный микробиологический метод, предназначенный для экспресс-диагностики и определения чувствительности смешанной микробиоты гнойного очага к антибактериальным препаратам.

Литература

1. Ипполитов ЕВ. Мониторинг формирования микробной биопленки и оптимизация диагностики воспалительных заболеваний пародонта. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. М.: МГМСУ, 2016, 48 с.
2. Фурсова НК. Лекарственная устойчивость микроорганизмов. М.: Онто-Принт, 2012, 248 с.
3. Царёв ВН. Лабораторная диагностика анаэробной (неклостридиальной) инфекции. Руководство по медицинской микробиологии. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая характеристика. Под ред. А.С.Лабинской, Н.Н.Костюковой. Кн. III, Т. 1. М.: Бином, 2013, с. 439-454.
4. Брусина ЕБ. Эпидемиология внутрибольничных инфекций в офтальмологических отделениях. Руководство по медицинской микробиологии. Оппортунистические инфекции: клинко-эпидемиологические аспекты. Под ред. А.С.Лабинской, Е.Г.Волиной, Е.П.Ковалёвой. Кн. III, Т. 2. М.: Бином, 2014, с. 682-96.
5. Антибиотики и противоинфекционный иммунитет. Научно-практическое издание. Под ред. Н.Д.Ющука, И.П.Балмасовой, В.Н.Царёва. М.: Практическая медицина, 2012, 232 с.
6. Александров МТ. и др. Устройство для мультисубстратной флуоресцентной идентификации биологических микрообъектов и их биологических свойств. Патент №93990 РФ, 28.09.2009.
7. Ушаков РВ, Царёв ВН. Антимикробная терапия в стоматологии. Принципы и алгоритмы. М.: Практическая медицина, 2018, 240 с.

References

1. Ippolitov EV. Monitoring the formation of microbial biofilm and optimizing the diagnosis of inflammatory periodontal diseases. Diss. Moscow: MSMSU, 2016, 48 p. (In Russian).
2. Fursova NK. Drug Resistance of Microorganisms. Moscow: "Onto-Print" Publ., 2012, 248 p. (In Russian).

3. Tsarev VN. Laboratory diagnosis of anaerobic (non-clostridial) infection. In: Labinskaya AS, Kostyukova NA. Guide to Medical Microbiology. Moscow: "Binom" Publ., 2013, pp. 439-454. (In Russian).
4. Brusina EB. Opportunistic infections: clinical and epidemiological aspects. In: Labinskaya AS, Volina EG, Kovaleva EP. Guide to Medical Microbiology. Moscow: "Binom" Publ., 2014, pp. 682-96. (In Russian).
5. Antibiotics and anti-infectious immunity. Edited by Yushchuk ND, Balmasova IP, Tsarev VN. Moscow: "Prakticheskaya meditsina" Publ., 2012, 232 p. (In Russian).
6. Alexandrov MT, et al. Device for multisubstrate fluorescence identification of biological microobjects and their biological properties. Patent RF N 93990; 2009. (In Russian).
7. Ushakov RV, Tsarev VN. Antimicrobial therapy in dentistry. Principles and algorithms. Moscow: "Prakticheskaya meditsina" Publ., 2018, 240 p. (In Russian).

Информация о соавторах:

Давыдов Дмитрий Викторович, доктор медицинских наук, профессор кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: d-davydov3@yandex.ru

Царёва Валентина Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической офтальмологии Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: fomicheva-e-m@yandex.ru

Лабазанов Асхаб Алиевич, научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: labazanov@yandex.ru

Подпорин Михаил Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Information about co-authors:

Dmitriy V. Davydov, MD, PhD, DSc, professor of department of eyes diseases of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: Delegatskaya Str. 20/1, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: d-davydov3@yandex.ru

Valentina V. Tsareva, junior research associate, laboratory of experimental and clinical ophthalmology, Research Institute of Medicine and Dentistry of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: Delegatskaya Str. 20/1, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: fomicheva-e-m@yandex.ru

Ashab A. Labazanov, research associate, laboratory of molecular biology investigation, Research Institute of Medicine and Dentistry of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: Delegatskaya Str. 20/1, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: labazanov@yandex.ru

Mikhail S. Podporin, junior research associate, laboratory of molecular biology investigation, Research Institute of Medicine and Dentistry of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: Delegatskaya Str. 20/1, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Значение оценки респираторного метаболизма лейкоцитов при разработке местной лекарственной формы для лечения пародонтальной инфекции

Т.П.Герасимова¹, Е.Н.Николаева², Р.В.Ушаков¹, Е.В.Ипполитов², А.Р.Ушаков², В.Н.Царёв²

¹ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Российская Федерация

Цель исследования. Оценка респираторного метаболизма нейтрофилов и влияния на их активность разрабатываемой пленки на основе полимера диплен с противовоспалительным и антибактериальным компонентами с использованием метода люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ), стимулированной опсонизированным зимозаном.

Материалы и методы. Влияние стоматологических адгезивных пленок: зарегистрированной Минздравом РФ – Диплен-Дента с хлоргексидином (Д-д Х) и экспериментальной – Диплен-Дента с хлоргексидином, кетопрофеном и токоферола ацетатом (Д-д КПХ) на активность клеток крови оценивали методом люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов цельной крови. Исследовали периферическую кровь 26 здоровых доноров в возрасте от 20 до 25 лет.

Результаты. Исследованные пленки «Диплен-Дента Х» и «Диплен-Дента КПХ» воздействуют на нейтрофильные гранулоциты в зависимости от исходного их функционального состояния. При низком индексе активации (<3,054) «Диплен-Дента КПХ» в большей степени, чем «Диплен-Дента Х», увеличивает все показатели ХЛ: спонтанную и стимулированную ХЛ. Он также значительно повышает индекс активации, в отличие от «Диплен-Дента Х», лишь незначительно влияющего на него. При высоких значениях I(O) (>4,34) оба препарата значительно уменьшают индекс активации, при этом относительная величина изменения индекса I/I(O) в группе 2 значимо меньше, чем в группе 1.

Заключение. Исследуемые полимерные пленки «Диплен-Дента Х» и «Диплен-Дента КПХ» воздействуют на нейтрофильные гранулоциты в зависимости от исходного функционального состояния клеток. Различия между пленками в отношении влияния на метаболическую активность нейтрофилов, очевидно, связаны с присутствием в составе «Диплен-Дента КПХ» кетопрофена.

Ключевые слова: полимер диплен, хлоргексидин, кетопрофен, токоферола ацетат, хемилюминесценция, нейтрофилы

Для цитирования: Герасимова Т.П., Николаева Е.Н., Ушаков Р.В., Ипполитов Е.В., Ушаков А.Р., Царёв В.Н. Значение оценки респираторного метаболизма лейкоцитов при разработке местной лекарственной формы для лечения пародонтальной инфекции. Бактериология. 2018; 3(2): 24–29. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-24-29

Leukocytes respiratory metabolism and it's evaluation for the development of a local polymer dosage form for treatment of periodontal infection

T.P.Gerasimova¹, E.N.Nikolaeva², R.V.Ushakov¹, E.V.Ippolitov², A.R.Ushakov², V.N.Tsarev²

¹Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

²A.I.Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Purpose. Evaluation the metabolic activity of neutrophilic granulocytes and the effect of polymer-based film containing anti-inflammatory and antibacterial components on neutrophil respiratory metabolism. The research is conducted using luminol-dependent chemiluminescence stimulated by opsonized zymosan.

Materials and methods. Two dental adhesive films have been analyzed in this study, "Diplen-Denta Ch" and "Diplen-Denta KPCh". "Diplen-Denta Ch" with chlorhexidine is drug approved by Russian Ministry of Health and is currently used in

Для корреспонденции:

Герасимова Татьяна Павловна, аспирант кафедры стоматологии
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного
профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ

Адрес: 123425, Москва, ул. Баррикадная, 2

Телефон: (499) 252-2104

E-mail: pochta.gerasimova@gmail.com

Статья поступила 17.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

Tatyana P. Gerasimova, graduate student, department of dentistry,
Russian Medical Academy of Continuous Professional Education
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Address: 2 Barrikadnaya str., Moscow, 123425, Russian Federation

Phone: (499) 252-2104

E-mail: pochta.gerasimova@gmail.com

The article was received 17.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

periodontology. "Diplen-Denta KPCh" is an experimental drug, which contains chlorhexidine, ketoprofen, and tocopherol acetate. The effect of both films on activity of neutrophilic granulocytes was assessed by luminol-dependent chemiluminescence, stimulated by opsonized zymosan. To conduct the assessment, peripheral blood of 26 healthy donors of age 20 to 25 years was studied.

Results. Both investigated films had an effect on neutrophil granulocytes depending on cells initial functional state. In persons with low activation index ($<3,054$), "Diplen-Denta KPCh" caused a greater increase in spontaneous and stimulated chemiluminescence, as well as the activation index. "Diplen-Denta Ch" had only a modest increase in the activation index. In the group with high values of $I(O)$ ($>4,34$), both drugs significantly decreased the activation index, while the relative magnitude of the $I/I(O)$ index change in group 2 was significantly smaller than in group 1.

Conclusions. Both investigated films have an influence on neutrophil granulocytes depending on initial functional state of the cells. The difference in effect of "Diplen-Denta KPCh" and "Diplen-Denta Ch" on neutrophils metabolic activity has been found to be related with the presence of ketoprofen

Keywords: polymer diplen, chlorhexidine, ketoprofen, tocopherol acetate, chemiluminescence, neutrophils

For citation: Gerasimova T.P., Nikolaeva E.N., Ushakov R.V., Ippolitov E.V., Ushakov A.R., Tsarev V.N. Leukocytes respiratory metabolism and it's evaluation for the development of a local polymer dosage form for treatment of periodontal infection. Bacteriology. 2018; 3(2): 24–29. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-24-29

При развитии инфекционно-воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта и пародонта существенную роль играет повышение интенсивности свободнорадикального окисления, которое при недостаточности систем антиоксидантной защиты приводит к альтерации тканей [1]. В ряде исследований установлено, что повышение уровня маркеров оксидативного стресса наблюдается при выявлении пародонтопатогенных видов 1 порядка – *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, а также *Treponema denticola*, т.е. представителей «красного комплекса» по Socransky. *Porphyromonas gingivalis*, ключевой пародонтопатоген, способен манипулировать иммунным ответом организма хозяина с целью длительного сохранения воспаления, деструкции тканевых структур и поддержания ресурса питательных веществ, необходимых для жизнедеятельности микробов [2–5].

При этом прогрессирование резорбции кости и утраты зубодесневого прикрепления происходит не непрерывно, а фазами, соответствующими периодам активного воспаления, что связано с респираторным метаболизмом лейкоцитов и продукцией активных форм кислорода [3, 6]. Оперативные вмешательства как источник механической травмы для тканей пародонта сами по себе также вызывают усиление оксидативного стресса, наблюдается рост системного уровня активных форм кислорода (АФК) в течение как минимум 5–7 дней после проведения хирургических операций [7–9]. Избыточная продукция свободных радикалов запускает цепные реакции окисления фосфолипидов клеточных мембран. Усиливается формирование нейтрофилами внеклеточных ловушек (NETs), выполняющих антимикробную функцию. Необходимым условием функционирования этого защитного механизма является наличие АФК [10, 11]. При этом нарушается кровообращение в тканях, усиливается агрегация тромбоцитов, что усугубляет расстройства микроциркуляции, способствует развитию отека и гипоксии [10].

Нейтрофилы, мигрировавшие из кровеносного русла, в пародонте локализуются в воспаленных тканях десны, максимальная их концентрация определяется в области эпителии десневой борозды [5, 12]. Именно в этих зонах находится точка приложения лекарственных средств, используемых для местной терапии пародонтита.

В настоящее время в стадии разработки и доклинических испытаний находится новая стоматологическая адгезивная пленка «Диплен-Дента КПХ», содержащая хлоргексидина биглюконат (0,01–0,03 мг/см²), кетопрофен (0,01–0,03 мг/см²) и α -токоферола ацетат (0,03–0,05 мг/см²) и обладающая комбинированным антимикробным, противовоспалительным и антиоксидантным действием. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что данная пленка активна в отношении пародонтопатогенной микрофлоры, не обладает острой и хронической токсичностью, раздражающим действием [13].

Цель работы – оценка респираторного метаболизма нейтрофилов и влияния на их активность разрабатываемой пленки на основе полимера диплен с противовоспалительным и антибактериальным компонентами с использованием метода люминолзависимой хемилюминесценции, стимулированной опсонизированным зимозаном.

Материалы и методы

Влияние стоматологических адгезивных пленок: зарегистрированной Минздравом РФ – Диплен-Дента с хлоргексидином (Д-д Х) и экспериментальной – Диплен-Дента с хлоргексидином, кетопрофеном и токоферола ацетатом (Д-д КПХ) на активность клеток крови оценивали путем регистрации ХЛ нейтрофильных гранулоцитов цельной крови 26 здоровых доноров в возрасте от 20 до 25 лет.

Для измерений было выбрано разведение крови в модификации Федорова Г.Н., Леонова С.Д. [14]. Разведенную кровь в объеме 400 мкл инкубировали со 100 мкл раствора пленки (или р-ра Хенкса в контрольной пробе), через 30 мин добавляли 100 мкл люминола и регистрировали спонтанную ХЛ в течение 60 мин. Стимулированную ХЛ определяли после внесения 100 мкл суспензии опсонизированного зимозана (SIGMA, США) в концентрации 20 мг/мл. Регистрировали индуцированный ХЛ ответ в течение 60 мин. Реакции проводили в полистироловых кюветках на хемилюминометре LUM-100 (ДИСофт, Россия) с программным обеспечением PowerGraph 3.0 при температуре 37°C.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA. Определяли медиану, минимальные, максимальные значения и интерквартильный размах

Таблица. Влияние растворов «Диплен-Дента Х» и «Диплен-Дента КПХ» на показатели спонтанной и стимулированной хемилюминесценции гранулоцитов (у.е.)

Показатель 1	Медиана	Нижн. кварт.	Верх. кварт.	Показатель 2	Медиана	Нижн. кварт.	Верх. кварт.	p
$S_{\text{спонт.}} O$	432,74	237,95	854,84	$S_{\text{спонт.}} \text{Д-д Х}$	560,21	302,86	1189,26	0,112
$S_{\text{спонт.}} \text{Д-д Х}$	560,21	302,86	1189,26	$S_{\text{спонт.}} \text{Д-д КПХ}$	641,84	260,53	781,46	0,028
$S_{\text{спонт.}} \text{Д-д Х}/S_{\text{спонт.}} O$	1,26	0,94	1,99	$S_{\text{спонт.}} \text{Д-д КПХ}/S_{\text{спонт.}} O$	1,18	0,92	1,66	0,443
$S_{\text{стим.}} O$	1601,15	1065,54	2782,11	$S_{\text{стим.}} \text{Д-д Х}$	1499,95	1106,83	2472,46	0,990
$S_{\text{стим.}} \text{Д-д Х}$	1499,95	1106,83	2472,46	$S_{\text{стим.}} \text{Д-д КПХ}$	1847,96	1479,78	2432,27	0,032
$S_{\text{стим.}} \text{Д-д Х}/S_{\text{стим.}} O$	1,00	0,76	1,41	$S_{\text{стим.}} \text{Д-д КПХ}/S_{\text{стим.}} O$	1,24	1,00	1,60	0,001
$I(O)$	3,00	1,43	7,45	$I(\text{Д-д Х})$	2,40	1,63	3,69	0,015
$I(\text{Д-д Х})/I(O)$	0,77	0,60	1,24	$I(\text{Д-д КПХ})$	3,27	2,19	4,42	0,142
				$I(\text{Д-д КПХ})/I(O)$	0,92	0,64	1,37	0,021

$S_{\text{спонт.}}$ – величина площади под кривой спонтанной ХЛ; $S_{\text{стим.}}$ – величина площади под кривой люминолзависимой ХЛ, индуцированной опсонизированным зимозаном; O – контрольный образец; Д-д Х – «Диплен-Дента Х»; Д-д КПХ – «Диплен-Дента КПХ»; $S_{\text{Х}}/S_{\text{О}}$ и $S_{\text{КПХ}}/S_{\text{О}}$ – изменение светосуммы S под влиянием препаратов по отношению к контрольному образцу $S_{\text{О}}$, содержащему соответствующее количество раствора Хенкса; $I = S_{\text{стим.}}/S_{\text{спонт.}}$ – индекс клеточной стимуляции; I/O – изменение индекса клеточной стимуляции под влиянием растворов пленок; Me – медиана оцениваемых показателей; нижн. кварт. – нижний квартиль; верх. кварт. – верхний квартиль.

спонтанной ($S_{\text{спонт.}}$) и индуцированной опсонизированным зимозаном ($S_{\text{стим.}}$) люминолзависимой ХЛ, изменения светосуммы S под влиянием препаратов по отношению к контрольному образцу $S_{\text{О}}$, содержащему соответствующее количество р-ра Хенкса ($S_{\text{Х}}/S_{\text{О}}$ и $S_{\text{КПХ}}/S_{\text{О}}$), индекса клеточной стимуляции $I = S_{\text{стим.}}/S_{\text{спонт.}}$, изменения индекса активации под влиянием растворов пленок I/O при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В таблице представлены данные оценки влияния растворов пленок Д-д Х и Д-д КПХ на показатели ХЛ: медиана (нижний квартиль; верхний квартиль). Установлено, что медиана значений спонтанной ХЛ при добавлении раствора Д-д Х была выше (в 1,3 раза) медианы спонтанной ХЛ в контрольных пробах, однако статистическая значимость не была достигнута. Медиана спонтанной ХЛ, индуцированной Д-д КПХ, была статистически достоверно больше (в 1,5 раза), чем в контрольных образцах с раствором Хенкса. В присутствии Д-д КПХ наблюдали статистически значимо достоверный рост стимулированной ХЛ – в 1,2 раза по сравнению с контролем, тогда как раствор Д-д Х подавлял стимулированную ХЛ в 1,1 раза, но статистическая значимость была не достигнута. Индекс активации ХЛ под влиянием Д-д Х – 2,4 (1,63; 3,69) статистически достоверно значимо снизился в 1,25 раза ($p = 0,015$), а в присутствии Д-д КПХ – 3,27 (2,19; 4,42) – увеличился в 1,1 раза, не достигнув статистически достоверной значимости ($p = 0,142$). При этом относительная величина изменения индекса активации для Д-д КПХ – 0,92 (0,64; 1,37) была статистически достоверно выше в 1,2 раза, чем для Д-д Х – 0,77 (0,60; 1,24) при $p = 0,021$.

Следует отметить, что относительное изменение индексов активации имело обратную статистически значимую корреляционную связь с исходным индексом активации $I(O)$ для обеих пленок (рис. 1, 2). Коэффициенты Спирмена равны $r = -0,751795$ и $r = -0,767692$ соответственно.

По результатам проведенных исследований были выделены две примерно равные по численности группы в зависимости от величины $I(O)$. В группу 1 вошли лица со значениями $I(O) < 3,054$ (14 человек), во вторую – с высокими значениями $I(O) > 4,340$ (12 человек).

Из рисунка 3 видно, что значения спонтанной ХЛ у пациентов 1-й группы – 777,72 (466,50; 1485,66) – были в 3,4 раза выше, чем у пациентов 2-й группы – 230,87 (163,24; 255,11). При добавлении Д-д Х значения спонтанной ХЛ у пациентов 1-й группы практически не изменялись – 717,72 (466,25; 1228,98), а у пациентов 2-й группы были в среднем в 1,9 раза выше – 434,90 (263,55; 680,33). При внесении Д-д КПХ наблюдалась похожая тенденция – у пациентов 1-й группы медиана и интерквартильный размах были равны 779,87 (530,99; 1670,70), а у пациентов 2-й группы в 1,3 раза выше контроля – 299,53 (233,25; 651,53) при $p < 0,05$.

Значения ХЛ лейкоцитов, стимулированной зимозаном (рис. 4), у представителей 1-й группы – 1323,79 (837,90; 2239,47) были в 1,5 раза ниже, чем у людей из 2-й группы – 1937,93 (1287,48; 3874,71). Добавление Д-д Х незначительно снижало стимулированную зимозаном ХЛ – 1286,52 (965,43; 2067,85) у пациентов 1-й группы, но повышало у пациентов 2-й группы – 1998,77 (1394,68; 2620,43). Добавление в систему Д-д КПХ статистически достоверно увеличивало стимулированную ХЛ – 1706,09 (1388,18; 2240,91) у пациентов 1-й группы, но не влияло на этот показатель у индивидуумов 2-й группы – 2085,63 (1495,31; 2566,90). При этом медиана значений ХЛ, стимулированной раствором Д-д КПХ, была статистически достоверно выше, чем медиана значений ХЛ, стимулированной раствором Д-д Х, в 1,33 раза ($p = 0,001$) у людей из 1-й группы. У индивидуумов 2-й группы статистически достоверной разницы не выявлено.

Индекс активации (рис. 5) в контрольных пробах людей из 1-й группы – 1,49 (1,16; 2,59) был статистически достоверно ниже в 5 раз, чем у представителей 2-й группы – 7,61 (5,24; 17,36). Раствор Д-д Х не влиял на индекс активации – 1,67 (1,15; 2,43) у обследуемых 1-й группы ($p = 0,730$) и статистически достоверно значимо снижал его у индивидуумов 2-й группы – 3,49 (2,34; 6,02) при $p = 0,004$. Раствор Д-д КПХ статистически достоверно увеличивал индекс активации лейкоцитов в 1,5 раза – 2,22 (1,37; 3,27) у людей в 1-й группе и снижал в 1,6 раза – 4,83 (3,40; 8,44) во 2-й группе.

Кроме этого, было установлено (рис. 6), что медиана и интерквартильный размах изменения индекса активации ХЛ, индуцированной Д-д Х, $I(X)/I(O)$ – 1,11 (0,85; 1,48), у людей (1-я группа) с исходной низкой спонтанной ХЛ лейкоцитов были статистически достоверно больше, в 1,9 раза,

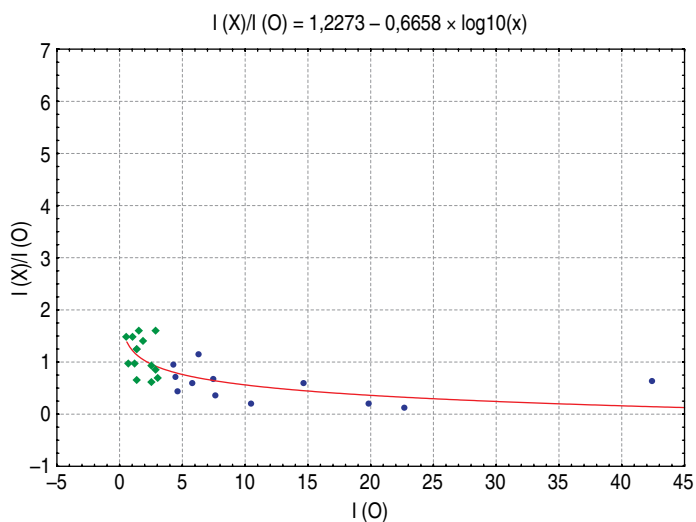


Рис. 1. Корреляционная зависимость изменения индекса активации в присутствии пленки Д-д X относительно контрольных проб.

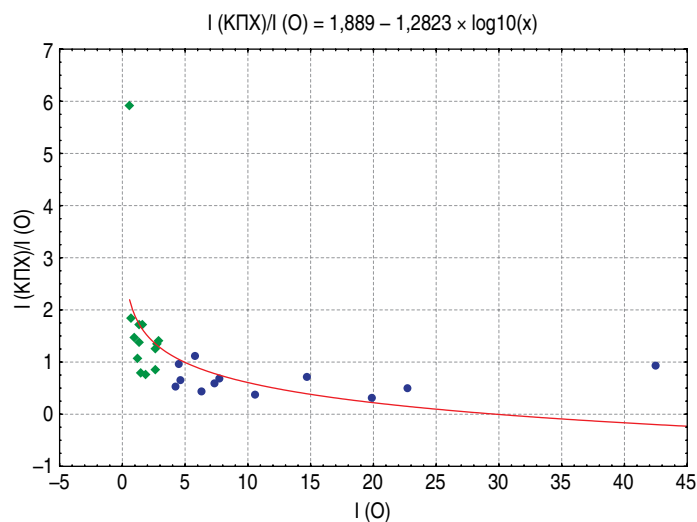


Рис. 2. Корреляционная зависимость изменения индекса активации в присутствии пленки Д-д КPX относительно контрольных проб.

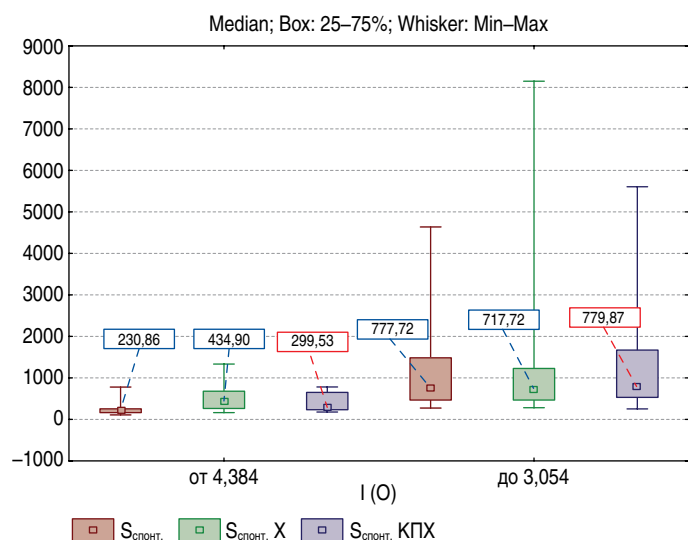


Рис. 3. Медианы значений спонтанной ХЛ в присутствии дипленовских пленок.

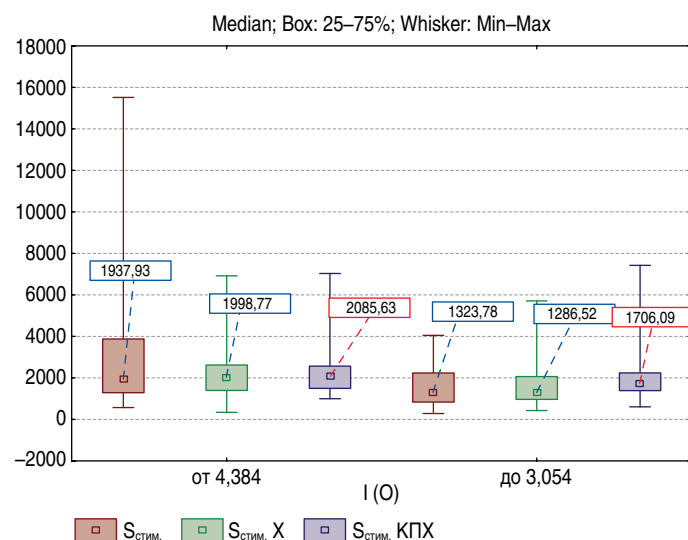


Рис. 4. Медианы значений ХЛ, стимулированной зимозаном, в присутствии дипленовских пленок.

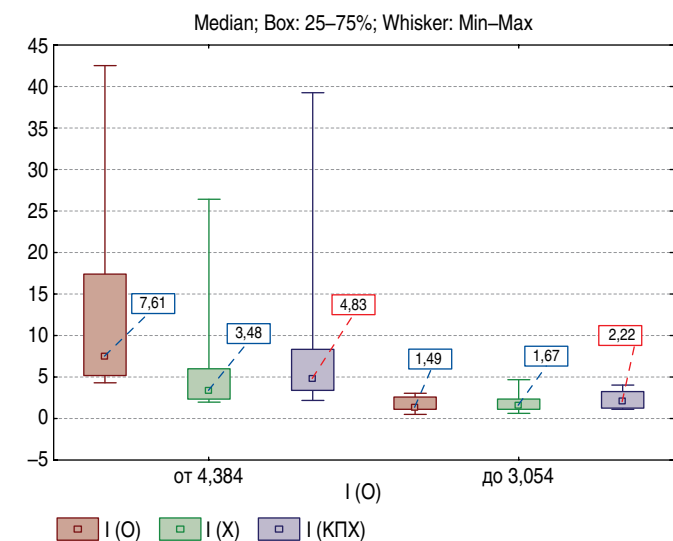


Рис. 5. Медианы значений индексов активации ХЛ в присутствии дипленовских пленок.

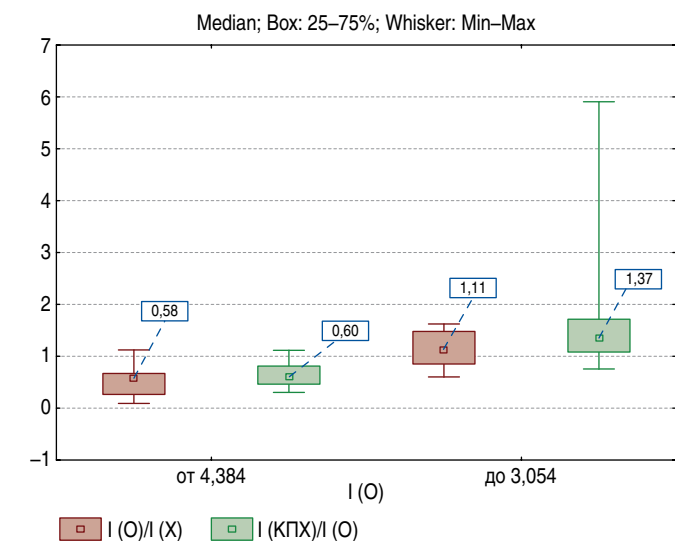


Рис. 6. Изменение индексов активации ХЛ, индуцированной Д-д X и Д-д КPX, по отношению к контрольным образцам.

чем у людей с высоким спонтанным ответом лейкоцитов (2-я группа) – 0,58 (0,27; 0,67). Прирост $I(KPX)/I(O)$ у представителей 1-й группы – 1,37 (1,08; 1,72) был статистически достоверно значимо в 2,3 раза больше, чем у людей из 2-й группы – 0,6 (0,46; 0,81).

Таким образом, при добавлении Д-д КPX индекс активации был незначительно выше, чем при добавлении Д-д Х у людей в обеих группах.

Нами исследовано влияние самоклеящейся пленки «Диплен-Дента КPX» на активность нейтрофильных гранулоцитов цельной крови, являющихся основным источником АФК, по сравнению с используемой в пародонтологии пленкой «Диплен-Дента Х», содержащей хлоргексидина биглюконат 0,01–0,03 мг/см² с использованием метода люминол-зависимой ХЛ.

В предыдущих работах Ушакова Р.В. и соавт. (2015) описано статистически значимое снижение спонтанной и стимулированной ХЛ, а также индекса стимуляции нейтрофильных гранулоцитов здоровых доноров под влиянием пленки «Диплен-Дента Х» [13]. Данные настоящего исследования подтверждают тенденцию о влиянии «Диплен-Дента Х» на индекс активации ($p = 0,015$), хотя статистически достоверная разница значений как спонтанной, так и стимулированной ХЛ выявлялась не всегда. Возможно, это связано с тем, что тип течения воспалительной реакции и прогрессирование хронического генерализованного пародонтита во многом определяются фагоцитарной активностью нейтрофилов и интенсивностью «респираторного взрыва» [7]. Регистрируемая спонтанная ХЛ свидетельствует о респираторном взрыве, возникающем в нейтрофилах в связи с фагоцитозом. Стимулированная ХЛ – показатель функциональной активности фагоцитов, отражение резервов их бактерицидной функции. Индекс стимуляции, рассчитываемый как отношение S стимулированной ХЛ к S спонтанной ХЛ, отражает состояние неспецифической реактивности организма [1, 7]. Поэтому логично предположить, что функциональная активность гранулоцитов периферической крови обследованных практически здоровых людей в группе 1 с исходным индексом активации ХЛ $I(O) < 3,054$ и в группе 2 с $I(O) > 4,34$ в настоящем исследовании определяется гипозергическим и гиперергическим типами реактивности соответственно.

В состав пленки «Диплен-Дента КPX», кроме хлоргексидина, включены два лекарственных средства: кетопрофен и α -токоферола ацетат (витамин Е). Последний оказывает выраженное антиоксидантное действие. Липофильная молекула α -токоферола способна инактивировать свободные радикалы непосредственно в гидрофобном слое мембран. Она отдает атом водорода свободному радикалу пероксида липида, восстанавливая его до гидропероксида, тем самым останавливая перекисное окисление липидов. При этом образовавшийся свободный радикал витамина Е стабилен и не вызывает цепную реакцию свободнорадикального окисления. Поскольку α -токоферол является непосредственно мембранным антиоксидантом, для проявления его действия необходима ассоциация молекулы с мембраной, на что требуется время. Непосредственно после добавления витамина Е процесс восстановления мембран не усиливается, и только высокие его концентрации проявляют эффективность через 24 ч [15].

Таким образом, установленные в настоящей работе различия во влиянии на метаболическую активность нейтрофилов пленки Д-д КPX в сравнении с «Диплен-Дента Х», очевидно, связаны с присутствием в его составе кетопрофена. Во всей совокупности влияние на индекс стимуляции статистически значимо более выражено для пленки «Диплен-Дента КPX» в сравнении с «Диплен-Дента Х». Необходимы дальнейшие исследования влияния изучаемых лекарственных форм на функциональную активность гранулоцитов при воспалительных заболеваниях, в том числе тканей пародонта.

Выводы

1. Исследуемые полимерные пленки «Диплен-Дента Х» и «Диплен-Дента КPX», предложенные для местного лечения воспалительных процессов в пародонте, по-разному влияют на респираторный метаболизм нейтрофильных гранулоцитов, что зависит как от состава активных компонентов, введенных в диплен, так и от исходного функционального состояния гранулоцитов.
2. При низком индексе активации ($< 3,054$) «Диплен-Дента КPX» в большей степени, чем «Диплен-Дента Х», увеличивает все показатели ХЛ: спонтанную и стимулированную ХЛ. Он также значимо повышает индекс активации, в отличие от «Диплен-Дента Х», лишь незначительно влияющего на него.
3. При высоких значениях $I(O)$ ($> 4,34$) оба препарата значимо уменьшают индекс активации, при этом относительная величина изменения индекса $I/I(O)$ в группе 2 значимо меньше, чем в группе 1. В группе 2 «Диплен-Дента КPX» в меньшей степени, чем «Диплен-Дента Х», повышает уровень спонтанной ХЛ, однако статистическая значимость не достигнута.

Литература

1. Грудянов АИ Фоменко ЕВ. Этиология и патогенез воспалительных заболеваний пародонта. М.: Изд-во Мед. информац. агентство, 2010, 89 с.
2. Ипполитов ЕВ, Николаева ЕН, Царев ВН. Биопленки полости рта – индукторы сигнальных систем врожденного иммунитета. Стоматология. 2017;96(4): 58-62. DOI: 10.17116/stomat201796458-62
3. Babaev EA, Balmasova IP, Mkrtumyan AM, Kostyukova SN, Vakhitova ES, Il'ina EN, et al. Metagenomic Analysis of Gingival Sulcus Microbiota and Pathogenesis of Periodontitis Associated with Type 2 Diabetes Mellitus. Bull Exp Biol Med. 2017 Oct;163(6):718-721. DOI: 10.1007/s10517-017-3888-6.
4. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. Mol Oral Microbiol. 2014 Dec;29(6):248-57. DOI: 10.1111/omi.12065.
5. Sochalska M, Potempa J. Manipulation of neutrophils by *Porphyromonas gingivalis* in the development of periodontitis. Front Cell Infect Microbiol. 2017 May 23;7:197. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00197.
6. Вольф ГФ, Ратейцхак ЭМ. Пародонтология. 2-е издание. Перевод с немецкого. М.: «МЕДпресс-информ», 2014, 548 с.
7. Царёв ВН, Балмасова ИП, Еремина ОФ. Бета-лактамы: цефалоспорины. В кн.: Антибиотики и противомикробный иммунитет. Под ред. Н.Д.Ющука, И.П.Балмасовой, В.Н.Царёва. М.: Практическая медицина, 2013, с. 56-78.
8. Царёв ВН, Пономарёва АГ, Кузнецов КВ, Ахмедов ГД, Стаценко ЕА. Функциональное состояние тиолдисульфидного звена антиоксидантной системы при хирургических операциях челюстно-лицевой области и в послеоперационном периоде. Военная медицина. 2015;3:119-22.

9. Liu C, Mo L, Niu Y, Li X, Zhou X, Xu X. The role of reactive oxygen species and autophagy in periodontitis and their potential linkage. *Front Physiol.* 2017 Jun 23;8:439. DOI: 10.3389/fphys.2017.00439
10. Коротина ОЛ, Генералов ИИ. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции. *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2012;4:23-32.
11. Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner WD. The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans. *Biomolecules.* 2015 May 4;5(2):702-23. DOI: 10.3390/biom5020702.
12. Vitkov L, Klappacher M, Hannig M, Krautgartner WD. Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2009 Oct;44(5):664-72. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2008.01175.x.
13. Ушаков РВ, Ушакова ТВ, Герасимова ТП, Царев ВН, Коркин ВВ. Разработка адгезивной пленки с комбинированным антимикробным, противовоспалительным и антиоксидантным действием. *DentalForum.* 2015;4:93.
14. Федоров ГН, Леонов СД. Особенности хемилюминесценции цельной разведенной крови. *Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал.* 2007;6(4). URL: www.smolensk.ru/user/sgma/MMORPH/TITL-16.htm
15. Howard AC, McNeil AK, McNeil PL. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. *Nat Commun.* 2011 Dec 20;2:597. DOI: 10.1038/ncomms1594. (In Russian).

References

1. Grudyanov AI Fomenko EV. *Etiologiya i patogenez vospalitel'nykh zabolevanii parodonta.* Moscow, 2010, 89 p. (In Russian).
2. Ippolitov EV, Nikolaeva EN, Tsarev VN. Oral biofilm: inductors of congenital immunity signal pathways. *Stomatology (Stomatologiya).* 2017;96(4):58-62. DOI: 10.17116/stomat201796458-62 (In Russian).
3. Babaev EA, Balmasova IP, Mkrtumyan AM, Kostyukova SN, Vakhitova ES, Il'ina EN, et al. Metagenomic Analysis of Gingival Sulcus Microbiota and Pathogenesis of Periodontitis Associated with Type 2 Diabetes Mellitus. *Bull Exp Biol Med.* 2017 Oct;163(6):718-721. DOI: 10.1007/s10517-017-3888-6.
4. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol.* 2014 Dec;29(6):248-57. DOI: 10.1111/omi.12065.
5. Sochalska M, Potempa J. Manipulation of neutrophils by *Porphyromonas gingivalis* in the development of periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 May 23;7:197. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00197.
6. Vol'f GF, Rateitskhak EM. *Parodontologiya.* 2nd edition. Moscow: «MEDpress-inform», 2014, 548 p. (In Russian).
7. Tsarev VN, Balmasova IP, Eremina OF. Beta-laktamy: tsefalosporiny. In: *Antibiotiki i protivoinfektsionnyi immunitet.* Edited by N.D.Yushchuk, I.P.Balmasova, V.N.Tsarev. Moscow: "Prakticheskaya meditsina", 2013, pp. 56-78. (In Russian).
8. Tsarev VN, Ponomareva AG, Kuznetsov KV, Achmedov GJ, Statsenko EA. The functional state of thiol-disulfide link of the antioxidant system in surgery maxillofacial area and in the postoperative period. *Voennaya meditsina.* 2015;3:119-22. (In Russian).
9. Liu C, Mo L, Niu Y, Li X, Zhou X, Xu X. The role of reactive oxygen species and autophagy in periodontitis and their potential linkage. *Front Physiol.* 2017 Jun 23;8:439. DOI: 10.3389/fphys.2017.00439
10. Korotina OL, Generalov II. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation, functions. *Immunopathology, Allergology, Infectology.* 2012;4:23-32. (In Russian).
11. Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner WD. The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans. *Biomolecules.* 2015 May 4;5(2):702-23. DOI: 10.3390/biom5020702.
12. Vitkov L, Klappacher M, Hannig M, Krautgartner WD. Extracellular neutrophil traps in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2009 Oct;44(5):664-72. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2008.01175.x.

Информация о соавторах:

Николаева Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения РФ
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: elnikolaeva@bk.ru

Ушаков Рафаэль Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой стоматологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ
Адрес: 123425, Москва, ул. Баррикадная, 2
Телефон: (499) 252-2104
E-mail: rafaelu@mail.ru

Ипполитов Евгений Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения РФ
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: ippo@bk.ru

Ушаков Алексей Рафаэлевич, кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии Научно-исследовательского медико-стоматологического института, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения РФ
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: rafaelu@mail.ru

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 им. А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения РФ
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: nikola777@rambler.ru

Information about co-authors:

Elena N. Nikolaeva, MD, PhD, DSc, professor of department of microbiology, virology, immunology of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: elnikolaeva@bk.ru

Rafael V. Ushakov, MD, PhD, DSc, professor, head of department of dentistry, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 2 Barrikadnaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (499) 252-2104
E-mail: rafaelu@mail.ru

Yevgeniy V. Ippolitov MD, PhD, DSc, professor, head of department of microbiology, virology, immunology of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: ippo@bk.ru

Aleksey R. Ushakov, MD, PhD, junior research associate, laboratory of immunology, Research Institute of Medicine and Dentistry of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: rafaelu@mail.ru

Viktor N. Tsarev, MD, PhD, DSc, professor, director of Research Institute of Medicine and Dentistry, head of department by microbiology, virology, immunology of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: nikola777@rambler.ru

Молекулярная диагностика пародонтита и метагеномный анализ микробиоты пародонта у пациентов с сахарным диабетом II типа

В.Н.Царёв¹, С.Д.Арутюнов¹, И.П.Балмасова¹, Э.А.Бабаев¹,
Е.Н.Николаева¹, Е.В.Ипполитов¹, Е.Н.Ильина², А.Г.Габибов³

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Российская Федерация;

³ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

Известно, что маркерами развивающегося пародонтита могут служить микробы-прокариоты так называемого «red-complex», или пародонтопатогены 1-го порядка – *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Течение сахарного диабета II типа сопровождается прогрессирующей атрофией альвеолярной костной ткани, развитием хронического пародонтита, приводящего к полной потере зубов. При анализе метагенома зубодесневой борозды, основанном на секвенировании 16S ДНК бактерий, статистически значимым было различие по наличию при пародонтите представителей семейств *Porphyromonadaceae* и *Fusobacteriaceae*, которые в случае сочетания пародонтита с сахарным диабетом II типа встречались в 1,9 раза чаще и в состав которых входили пародонтопатогены 1-го порядка, установленные методом ПЦР. При пародонтите отмечено достоверное снижение в биопленке бактерий семейства *Sphingobacteriaceae*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу изменения микробиоты при сочетанной патологии и возможного патогенетического значения наблюдаемых изменений.

Ключевые слова: пародонтит, сахарный диабет II типа, пародонтопатогены 1-го порядка, 16S секвенирование, метагеномный анализ, ПЦР, микробиота, *Sphingobacteriaceae*

Для цитирования: Царёв В.Н., Арутюнов С.Д., Балмасова И.П., Бабаев Э.А., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В., Ильина Е.Н., Габибов А.Г. Молекулярная диагностика пародонтита и метагеномный анализ микробиоты пародонта у пациентов с сахарным диабетом II типа. Бактериология. 2018; 3(2): 30–37. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-30-37

Molecular diagnostic of periodontitis and metagenomic analysis of the periodontum microbiota in patients by type II diabetes mellitus

V.N.Tsarev¹, S.D.Arutunov¹, I.P.Balmasova¹, E.A.Babaev¹,
E.N.Nikolaeva¹, E.V.Ippolitov¹, E.N.Ilina², A.G.Gabibov³

¹A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

²Federal Research and Clinical Center Of Physical-Chemical Medicine Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation;

³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

It is known that the markers of periodontitis progression is linked with the development of “red-complex” prokaryotes or periodontopathogenes of type I – *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. It is widely accepted that diabetes mellitus is associated with several complications such as: progressive atrophy of alveolar

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 им. А.И.Евдокимова» Минздрава России

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

Телефон: (495) 609-6700

E-mail: nikola777@rambler.ru

Статья поступила 17.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

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

Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation

Phone: (495) 609-6700

E-mail: nikola777@rambler.ru

The article was received 17.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

bone tissue, development of periodontitis, leading to complete loss of teeth. Metagenomic analysis of the microbiota of the dentogingival sulcus, based on the sequencing of 16S DNA bacteria, showed statistically significant difference in the presence of representatives of the *Porphyromonadaceae* and *Fusobacteriaceae*, which in the case of a combination of periodontitis with type 2 diabetes were 1.9 times more common. A significant reduction of bacteria of *Sphingobacteriaceae* representatives have also observed in periodontitis biofilms. The results support the change in the microbiota in the studied combined pathology and possible pathogenetic values observed changes.

Keywords: periodontitis, type II diabetes, periodontopathogenes of type I, 16S sequencing, metagenomic analysis, PCR, microbiota, *Sphingobacteriaceae*

For citation: Tsarev V.N., Arutunov S.D., Balmasova I.P., Babaev E.A., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V., Ilina E.N., Gabibov A.G. Molecular diagnostic of periodontitis and metagenomic analysis of the periodontum microbiota in patients by type II diabetes mellitus. *Bacteriology*. 2018; 3(2): 30–37. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-30-37

В последнее время все больше утверждается концепция, что хронический генерализованный пародонтит нельзя рассматривать в рамках частной патологии. Установлено, что это заболевание имеет ассоциативные взаимосвязи с различными эндокринными, иммунологическими и другими системными расстройствами, которые, в свою очередь, могут быть причиной других болезней, возможно, являющихся вторичными по отношению к самому пародонтиту. Одной из безусловно сопряженных патологий является сахарный диабет. Пародонтит у больных сахарным диабетом имеет те же формы по клиническому течению, по тяжести проявлений, по онтогенетическому признаку, по распространенности, что и у лиц, страдающих пародонтитом, но не имеющих сахарного диабета. Однако, пародонтит у больных сахарным диабетом, по мнению многих авторов, плохо поддается лечению и имеет неблагоприятный прогноз [1–3].

В России в настоящее время более 2,5 млн человек страдают сахарным диабетом, среди которых 90% приходится на сахарный диабет II типа. Примерно через год после выявления сахарного диабета 100% пациентов имеют признаки хронического пародонтита с перспективой полной потери зубов [4]. С другой стороны, по результатам многочисленных исследований проблемы, пародонтит является самым частым осложнением сахарного диабета, который неизбежно развивается практически у каждого заболевшего. При этом пародонтит не только сам является осложнением, но и увеличивает риск других осложнений, так как затрудняет проведение полноценной диетотерапии и коррекцию присущих диабету метаболических нарушений, снижает регенеративную способность тканей пародонта и резко ухудшает качество жизни больных диабетом [1, 5].

Важными патогенетическими звеньями в развитии и прогрессировании заболеваний пародонта при сахарном диабете считают микроциркуляторные расстройства (диабетические микроангиопатии), нарушения в иммунной системе, ацидоз. Расстройства микроциркуляции и функций иммунных клеток могут быть как первичными (под влиянием сахарного диабета), так и вторичными (под влиянием воспалительного процесса в пародонте). Причина воспалительных процессов в пародонте – ксеростомия и вторичный иммунодефицит. Заболевания пародонта можно отнести к группе малых признаков сахарного диабета [2, 6].

Авторы многоцентровых исследований в мире склоняются к выводу о том, что пародонтопатогенные бактерии явля-

ются одним из факторов, инициирующих развитие сахарного диабета [1, 2, 7].

Условия для достаточно устойчивой взаимосвязи пародонтита с сахарным диабетом II типа возникают в связи с тем, что сахарному диабету сопутствует целый ряд метаболических и иммунологических сдвигов, включающих оксидативный стресс, изменение профиля цитокинной продукции в иммунной системе, модуляцию рецепторного аппарата клеток и т.д. [1, 3, 6, 8]. Указанные сдвиги в сочетании с ростом содержания глюкозы в ротовой жидкости создают условия для изменения микробиоты полости рта, появления в ее составе пародонтопатогенных видов и, как следствие, – развития хронического рецидивирующего воспалительного процесса в пародонте с последующей деструкцией альвеолярной кости и выпадением зубов [5, 9].

Перечисленные выше факторы определяют прогрессирование пародонтита, первичным звеном которого является, как известно, колонизация поддесневой биопленки пародонтопатогенными видами «красного комплекса», или 1 порядка. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* – основные пародонтопатогены 1 порядка, обладающие высокой вирулентностью и способностью к внутриклеточному паразитизму, которые определяют развитие воспалительно-деструктивного процесса, составляющего клиническую и морфологическую сущность пародонтита [2, 5, 9–11].

Существенную роль в деструкции тканей пародонта при наличии прочих факторов риска и образования устойчивых ассоциаций ранних, промежуточных и поздних колонизаторов играют пародонтопатогенные виды 2 порядка – *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Wolinella recta*. Параллельно рассматриваются такие неблагоприятные факторы, как неудовлетворительная гигиена полости рта, профессиональные вредности, нерациональная диета, в частности, снижение употребления белковых продуктов и отсутствие грубой пищи, снижающей нагрузку на пародонт, курение, неблагоприятные экологические факторы [1, 2, 5, 9].

Учитывая тот факт, что в составе биопленки микробиота функционирует как единый биологический комплекс [12], особое значение в расшифровке патогенеза пародонтита, в частности, при сахарном диабете II типа, приобретает получение с помощью новых технологий «микробного портрета» биопленки десневого кармана, что создает перспективу

прогнозирования риска развития и тяжести течения хронического пародонтита, а в дальнейшем – разработку новых принципов коррекции пародонтопатогенного характера микробиоты при данной патологии как элемента персонифицированной медицины будущего.

В связи с этим целью исследования было определение особенностей микробного состава биопленки зубодесневой борозды при хроническом пародонтите и сочетании хронического пародонтита с сахарным диабетом II типа на основе применения современных молекулярных и метагеномных технологий.

Пациенты и методы

Нами проведено комплексное стоматологическое обследование 74 пациентов, обратившихся к стоматологу для лечения или с профилактической целью, которые соответствовали критериям включения в исследование и заполнили информированное согласие.

Группу 1 составили 22 пациента (11 мужчин и 11 женщин в возрасте 47–63 лет), у которых СД II типа сочетался с явлениями хронического пародонтита. Им был поставлен диагноз пародонтита средней степени тяжести, подтвержденный детальной характеристикой стоматологического статуса (табл. 1) и результатами ПЦР-диагностики на обнаружение генетических маркеров пародонтопатогенных бактерий 1-го и 2-го порядка.

В группу 2 вошли 30 пациентов (13 мужчин и 17 женщин в возрасте 42–60 лет), которые не предъявляли жалоб, а воспалительные заболевания пародонта были выявлены у них при обращении по поводу лечения кариеса и его осложнений. На основании клинических данных, показателей пародонтальных индексов (табл. 1) и результатов ПЦР-диагностики им был поставлен диагноз «пародонтит средней степени тяжести», подтвержденный детальной характеристикой стоматологического статуса (табл. 1) и результатами ПЦР-диагностики.

Контрольную группу 3 сформировали 22 лица (9 мужчин и 13 женщин в возрасте 25–28 лет) со здоровым (интактным) пародонтом и отсутствием СД II типа. В эту группу включены только обследуемые с отрицательными результатами ПЦР-диагностики на обнаружение генетических маркеров пародонтопатогенных бактерий 1-го и 2-го порядка.

Гигиеническое состояние пациентов групп сравнения 1 и 2 было удовлетворительным и сопоставимым. По данным анамнеза у пациентов этих групп были выявлены следующие коморбидные заболевания: вегето-сосудистая дистония, симптоматическая артериальная гипертензия, артериальная гипертензия. Давность заболевания пародонтитом составляла 5–10 лет. Проводимое ранее пародонтологическое лечение пациентов обеих групп включало удаление зубных отложений, местную противовоспалительную терапию и по показаниям – юретаж пародонтальных карманов.

У обследуемых контрольной группы 3 (без хронического пародонтита и СД II типа) гигиеническое состояние десен было хорошим, а пародонтологические индексы соответствовали нормальным значениям (см. табл. 1).

Срок наблюдения за всеми обследуемыми был 1,5 года.

Таблица 1. Состояние гигиены и пародонтальные индексы обследуемых в группах сравнения

№	Группа	Индексы				
		гигиенические		пародонтальные		
		ОHI-S	RHP	PMA	PI	PDI
1.	Пародонтит (+) СД тип 2 (+)	1,1	1,1	56,4%	3,9	3,4
2.	Пародонтит (+) СД тип 2 (–)	0,7	0,7	44,8%	3,6	3,1
3.	Здоровый пародонт:					
	Пародонтит (–) СД тип 2 (–)	0,6	0,5	11,7%	0	2,1
3.	Пародонтит (+) СД тип 2 (–), но через 1,5 года: СД тип 2 (+)	1,2	1,1	47,6%	3,8	3,2

Взятие материала проводилось из 4 участков в области зубодесневой борозды с помощью стерильных бумажных эндодонтических штифтов (№30), которые помещали в пробирку с 0,2 мл физиологического раствора.

Молекулярно-генетические исследования. Экстракцию ДНК выполняли с использованием набора ДНК-экспресс (ООО НПФ «Литех») в соответствии с инструкцией производителя. В случае необходимости выделенную ДНК хранили при температуре –20°C. Качественную оценку частоты выявления маркерной ДНК пародонтопатогенов 1 и части пародонтопатогенов 2 порядка (*T. denticola*, *P. intermedia*) проводили с помощью системы Мульти-Дент-5 (ООО НПФ «ГенЛаб», Россия). Для выявления остальных пародонтопатогенов 2 порядка использовали систему Micro-IDent@plus («Hain Lifescience», Германия), использующую принцип обратной гибридизации [11].

Количественную оценку содержания маркерной ДНК *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *F. nucleatum/periodonticum*, *P. endodontalis* в зубодесневом налете проводили с использованием набора «Дентоскрин» производства ООО НПФ «Литех», в соответствии с инструкцией (количественная ПЦР в реальном времени) [7].

Тотальную ДНК из образцов зубного налета выделяли с использованием QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen) согласно инструкциям производителя. Библиотеку ампликонов для 16S секвенирования готовили с использованием праймеров 341F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') и 801R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3') согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part #15044223 Rev. B). Секвенирование библиотеки и анализ полученных данных осуществляли с использованием генетического анализатора MiSeq (Illumina) и MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycle) в соответствии с инструкциями производителя. Визуализацию результатов осуществляли с использованием программы MEGAN5 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan5/>).

Статистическую обработку результатов проводили посредством пакета статистических программ SPSS, версия 21.

Результаты и обсуждение

При использовании классического подхода оценки частоты обнаружения маркерной ДНК пародонтопатогенных видов, прежде всего, мы обращали внимание на выделение пародонтопатогенных бактерий «красного комплекса», или 1 порядка [11, 12]. При этом были установлены существен-

Таблица 2. Показатели содержания пародонтопатогенных бактерий в десневой жидкости пациентов групп сравнения

Вид пародонтопатогенных бактерий	Медиана [минимум; максимум] в геном-эквивалентах на 1 мл десневой жидкости			Вероятность различий по критерию χ^2		
	больные сахарным диабетом и пародонтитом	больные пародонтитом	здоровые лица	p_1	p_2	p_3
<i>P. gingivalis</i>	45 258 [0; 860000]	27 [0; 71900]	0 [0; 102]	0,001*	0,001*	0,238
<i>T. forsythia</i>	1215 [0; 750000]	124 [0; 624000]	0 [0; 293000]	0,308	0,046*	0,313
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	649 [0; 138000]	177 [0; 2990000]	0 [0; 2990000]	0,355	0,865	0,539
<i>T. denticola</i>	54 200 [0; 1160000]	1053 [0; 2890000]	0 [0; 2890000]	0,005*	0,005*	0,769
<i>P. intermedia</i>	138 [0; 940000]	76 [0; 471000]	0 [0; 95200]	0,300	0,261	0,920
<i>F. nucleatum/periodonticum</i>	72 800 [120; 732000]	3000 [0; 2320000]	57 400 [0; 2320000]	0,030*	0,336	0,441
<i>P. endodontalis</i>	5840 [0; 880000]	546 [0; 1160000]	0 [0; 1160000]	0,298	0,300	0,968

Примечание: p_1 – вероятность различий в группах больных сахарным диабетом/пародонтитом и только пародонтитом, p_2 – вероятность различий в группах больных сахарным диабетом/пародонтитом и здоровых лиц, p_3 – вероятность различий в группах больных пародонтитом и здоровых лиц, * – достоверность различий по критерию Манна–Уитни при $p < 0,05$.

ные различия по частоте ассоциаций пародонтопатогенов и их видовому составу, то есть по числу входящих в их состав видов. Оказалось, что только у одного из 22 человек контрольной группы с интактным пародонтом (4,6%) была выявлена ДНК *A. actinomycetemcomitans*, у двух человек (9,1%) – *T. forsythia*, а *P. gingivalis* в норме не выявляли. Частота обнаружения пародонтопатогенов 2 порядка в этой группе была следующей: у одного пациента (4,6%) выявлена ДНК *T. denticola* и *P. intermedia*, *P. micra* выявили в четырех образцах (18,1%), *C. rectus*, *E. nodatum* – в трех (13,6%), *E. corrodens* – в одном (4,6%) и чаще всего – *F. nucleatum* и *Capnocytophaga spp.* – в семи (31,8%) образцах.

В итоге у 17 человек контрольной группы с интактным пародонтом в области зубодесневой борозды (77,3%) не было выявлено ни одного из исследуемых нами видов пародонтопатогенов 2 порядка, у 5 (22,7%) – выявлена маркерная ДНК одного вида, и у одного (4,5%) – двух видов.

Напротив, у больных хроническим пародонтитом (30 пациентов) хотя бы один вид из трех представителей пародонтопатогенной группы 1 порядка определяли у всех больных хроническим пародонтитом. Один вид пародонтопатогенов 1 порядка был определен у двух пациентов (6,6%), два вида – у пяти (16,7%), три вида – у десяти (33,3%), четыре вида – у шести (20%) и пять видов – у пяти (16,7%) больных хроническим пародонтитом (с участием пародонтопатогенов 2 порядка).

Схожая картина наблюдалась при пародонтите, осложнившем течение сахарного диабета II типа (22 пациента). Хотя бы один вид из трех представителей пародонтопатогенной группы 1 порядка определяли у всех больных хроническим пародонтитом с сахарным диабетом, так же, как и без такового, однако частота выявления разных видов в ассоциациях у пациентов данной группы существенно возрас- тала ($p < 0,05$). Так, один вид пародонтопатогенов 1 порядка был определен у трех пациентов (14,6%), два вида – у пяти (22,7%), три вида – у одиннадцати (50,0%), четыре вида – у шести (27,2%) и пять видов – у семи (31,8 %) больных хроническим пародонтитом (с участием пародонтопатогенов 2 порядка).

Таким образом, многовидовые ассоциации пародонтопатогенных бактерий гораздо чаще встречались в области зубодесневой борозды у больных хроническим пародонтитом при его сочетании с сахарным диабетом. Причем примерно у 2/3 пациентов с хроническим пародонтитом были выявлены ассоциации 2–4 видов пародонтопатогенов 1 и 2 порядка, а частота выявления ассо-

циаций пародонтопатогенных бактерий 1 и 2 порядка у больных пародонтитом и сахарным диабетом II типа была в 1,5–2 раза выше, чем при пародонтите без сахарного диабета.

Интересные результаты были получены по данным молекулярной диагностики с помощью ПЦР в реальном времени при анализе частоты выделения пародонтопатогенов 1 и 2 порядка в составе микробиоты зубодесневой борозды. В процессе исследования мы регистрировали частоту встречаемости каждого из 7 определяемых видов бактерий у пациентов основной группы и групп сравнения в количестве, превышающем установленные пороговые значения: 10^4 – для *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, 10^5 – для *Porphyromonas gingivalis*, *Tanarella forsythia*, *Porphyromonas endodontalis*, 10^6 – для *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*. В контрольной группе здоровых лиц с интактным пародонтом указанные пороговые значения были превышены в единичных случаях. Одновременно проводили сопоставление абсолютных значений количественной ПЦР в реальном времени, выраженных в геном-эквиваленте/мл между группами сравнения,

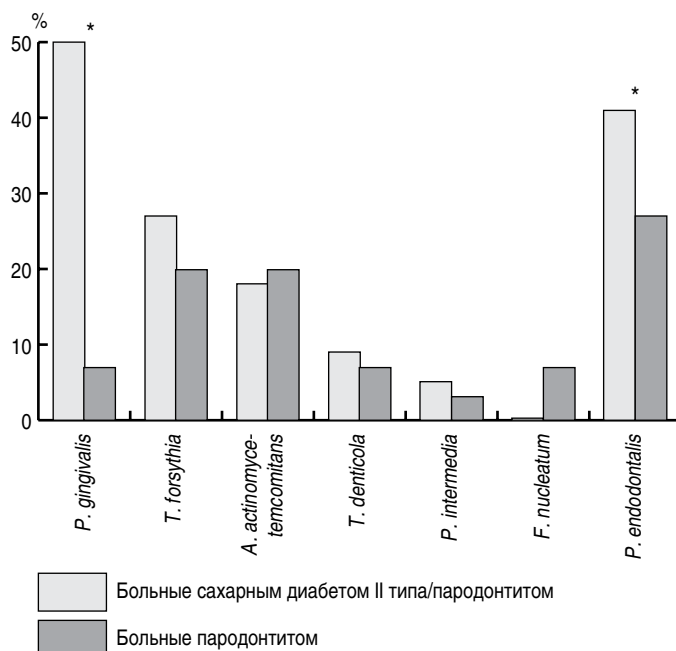
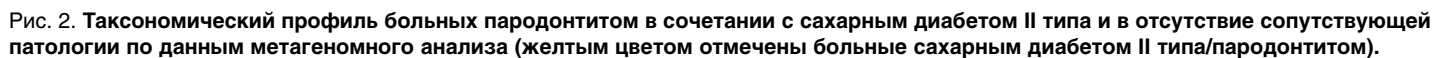


Рис. 1. Частота выделения маркерной ДНК отдельных видов пародонтопатогенных бактерий у больных сахарным диабетом II типа + хроническим пародонтитом и только хроническим пародонтитом по данным ПЦР в реальном времени.

частотного способа, принятого в клинико-стоматологической практике, позволил выявить гораздо более широкий спектр различий, особенно при сопоставлении с группой здоровых лиц.

Так, у больных сахарным диабетом II типа развитие пародонтита сопровождалось достоверным ростом содержания в жидкости зубодесневой борозды *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, а при сопоставлении с группой больных пародонтитом – еще и *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, при отсутствии различий по содержанию *Tanerella forsythia* и других идентифицированных видов.

Далее была сделана попытка выяснить, не влияет ли сахарный диабет II типа на вовлечение в поражение паронихии.



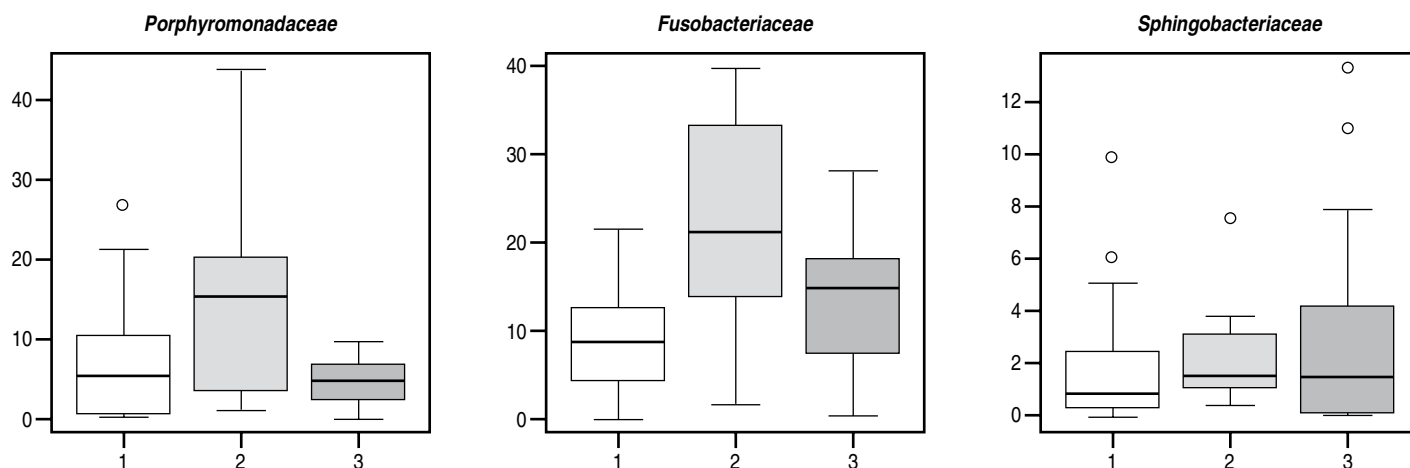


Рис. 3. 95% доверительные интервалы частоты встречаемости в составе микробиоты зубодесневой борозды представителей семейств *Porphyromonadaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae* (1 – больные пародонтитом, 2 – больные сахарным диабетом II типа/пародонтитом, 3 – здоровые лица группы контроля).

донта представителей каких-либо других семейств бактерий, определяемых методом секвенирования гена 16S рибосомной РНК. Результаты такого исследования по определению таксономического профиля микробиоты зубодесневой борозды у больных групп сравнения представлены на рисунке 2.

Установлено, что статистически значимым было только различие по наличию в составе микробиоты зубодесневой борозды представителей семейств *Porphyromonadaceae* и *Fusobacteriaceae*, которые в случае сочетания пародонтита с сахарным диабетом II типа встречались в 1,9 раза чаще (рис. 3). В состав именно этих семейств входят *Porphyromonas gingivalis* и *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, этиологическое значение которых при сочетании названных патологических состояний уже было отмечено выше.

Есть и еще одно интересное наблюдение, которое свидетельствует о значительном уменьшении в составе биопленок при пародонтите независимо от сопутствующей патологии представителей семейства *Sphingobacteriaceae* (рис. 3), которые, возможно, принимают участие в формировании компонентов матрикса смешанных биопленок в организме, что по-новому позволяет объяснить структурные различия биопленок, формируемых в норме и при пародонтите, выявленные ранее с помощью сканирующей электронной микроскопии [10].

В заключение следует отметить следующее. В настоящей работе представлен материал, обобщающий метагеномные исследования микрофлоры пародонта у представителей населения Московской области. Основная особенность формирования пародонтопатогенной микрофлоры у больных сахарным диабетом II типа касалась более значительной роли в этиологии пародонтита наиболее патогенного вида – *Porphyromonas gingivalis*, который относится к пародонтопатогенным видам 1 порядка [6]. Что касается *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola*, то их роль в этиологии пародонтита оставалась неизменной независимо от сопутствующей патологии. Определенное этиологическое значение имели также и пародонтопатогенные виды 2 порядка, выполняющие при формировании биопленок роль промежу-

точных колонизаторов, в частности, *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*.

При этом отдельного внимания требует вновь установленный факт снижения в составе биопленки при пародонтите бактерий семейства *Sphingobacteriaceae*, участвующих в продукции и обмене сфинголипидов с их способностью влиять на обменные процессы, в том числе и на чувствительность клеток к инсулину [13]. Описанный феномен лишний раз подтверждает концепцию о первичной роли пародонтита в патогенезе сахарного диабета II типа.

Возможно, что одной из причин прогрессирования диабета является индукция пародонтопатогенными видами в очаге воспаления провоспалительных цитокинов, которые, как известно, повышают резистентность к инсулину. Повидимому, хроническое рецидивирующее воспаление при пародонтите способствует развитию дисбиотических сдвигов, а затем – диабета и сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6, 8].

На основании полученных данных можно заключить, что современные технологии анализа микробиоты биопленки полости рта расширяют наши возможности в раскрытии новых сторон патогенеза такого частого стоматологического заболевания как хронический пародонтит в его взаимодействии с соматической патологией, в частности, с сахарным диабетом II типа. Очевидно, что в результате введения в лабораторную практику новых молекулярно-биологических технологий, основанных на приемах ПЦР-диагностики и высокопроизводительного секвенирования, удалось обнаружить и другие микроорганизмы, которые культивируются и не выявляются при обычном бактериологическом исследовании, в частности, представители семейства *Sphingobacteriaceae*.

Литература

1. Янушевич ОО, Царев ВН, Парунова СН. Влияние микрофлоры полости рта на регенерацию тканей пародонта у больных сахарным диабетом. Ортодонтия. 2004;3:15-7.
2. Matsushita K, Hamaguchi M, Hashimoto M, Yamazaki M, Yamazaki T, Asai K, et al. The novel association between red complex of oral microbe and body mass index

- in healthy Japanese: a population based cross-sectional study. *J Clin Biochem Nutr.* 2015 Sep;57(2):135-9. DOI: 10.3164/jcbs.15-19.
3. Patil VS, Patil VP, Gokhale N, Acharya A, Kangokar P. Chronic periodontitis in type 2 diabetes mellitus: oxidative stress as a common factor in periodontal tissue injury. *J Clin Diagn Res.* 2016 Apr;10(4):BC12-6. DOI: 10.7860/JCDR/2016/17350.7542
4. Богомолов МВ. Пародонтит как неспецифическое осложнение сахарного диабета. Подходы к профилактике. *Русский медицинский журнал.* 2011; 13:828-32.
5. Zhou M, Rong R, Munro D, Zhu C, Gao X, Zhang Q, Dong Q. Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PLoS One.* 2013 Apr 22;8(4):e61516. DOI: 10.1371/journal.pone.0061516
6. Орехова ЛЮ, Осипова МВ. Патология пародонта при сахарном диабете. В кн.: Национальное руководство. Пародонтология. Под ред. чл.-корр. РАН, проф. О.О.Янушевича, проф. Л.А. Дмитриевой. 2-е издание. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2018, с. 293-297.
7. Ребриков ДВ. ПЦР в реальном времени. М.: БИНОМ, 2014, 223 с.
8. Wang G.P. Defining functional signatures of dysbiosis in periodontitis progression. *Genome Med.* 2015 Apr 27;7(1):40. DOI: 10.1186/s13073-015-0165-z.
9. Царев ВН, Николаева ЕН, Ипполитов ЕВ. Пародонтопатогенные бактерии – основной фактор возникновения и развития пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2017;5:101-12.
10. Ипполитов ЕВ, Диденко ЛВ, Царёв ВН. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015;60(12):59-64.
11. Николаева ЕН, Царев ВН, Панин АМ, Чувилин ВИ, Ипполитов ЕВ, Хитаршвили МВ, и др. Ассоциативные связи пародонтопатогенных видов бактерий I и II порядков в смешанных биопленках у пациентов с перимплантитом. *Стоматология для всех.* 2014;4:38-42.
12. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Feb;19(2):107-12. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x.
13. Straczkowski M, Kowalska I. The role of skeletal muscle sphingolipids in the development of insulin resistance. *Rev Diabet Stud.* 2008 Spring;5(1):13-24. DOI: 10.1900/RDS.2008.5.13
6. Orekhova LYu, Osipova MV. Pathology of periodontal disease in diabetes mellitus. In: O.O.Yanushevich, L.A.Dmitriyev. *Periodontics.* 2nd ed. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ., 2018, pp. 293-7. (In Russian).
7. Rebrikov DV. Real-time PCR. Moscow: "BINOM" Publ., 2014, 223 p. (In Russian).
8. Wang G.P. Defining functional signatures of dysbiosis in periodontitis progression. *Genome Med.* 2015 Apr 27;7(1):40. DOI: 10.1186/s13073-015-0165-z.
9. Tsarev VN, Nikolaeva EN, Ippolitov EV. Periodontopathogenic bacteria of the main factors of emergence and development of periodontitis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2017;5:101-12. (In Russian).
10. Ippolitov EV, Didenko LV, Tsarev VN. The characteristics of morphology of biofilm of periodontium under inflammatory diseases of gums (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, Candida-associated periodontitis) according results of electronic microscopy. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2015;60(12):59-64. (In Russian).
11. Nikolaeva EN, Tsarev VN, Panin AM, Chuvilkin VI, Ippolitov EV, Hitarshvili MV, et al. Studying associative communications of periodontal pathogenic kinds of bacteria of I and II orders at patients with peri-implantitis. *Stomatologiya dlya vsekh (International Dental Review).* 2014;4:38-42.
12. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Feb;19(2):107-12. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x.
13. Straczkowski M, Kowalska I. The role of skeletal muscle sphingolipids in the development of insulin resistance. *Rev Diabet Stud.* 2008 Spring;5(1):13-24. DOI: 10.1900/RDS.2008.5.13

References

Информация о соавторах:

Арутюнов Сергей Дарчоевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтической стоматологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: arutunov.sd@mail.ru

Балмасова Ирина Петровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: immunolab@mail.ru

Бабаев Эмир А., аспирант кафедры пропедевтической стоматологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: babaev@mail.ru

Николаева Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: elnikolaeva@bk.ru

Ипполитов Евгений Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (495) 609-6700
E-mail: ippo@bk.ru

Ильина Елена Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заместитель генерального директора по научной работе, руководитель отдела молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»
Адрес: 119146, Москва, ул. Большая Пироговская, 19, стр. 1
Телефон: (499) 245-0471

Габиров Александр Габирович, доктор химических наук, директор ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
Телефон: (495) 727-3860
E-mail: gabibov@mx.ibch.ru

Information about co-authors:

Sergey D. Arutjunov, MD, PhD, DSc, professor, head of department of propedeutic dentistry of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: arutjunov.sd@mail.ru

Irina P. Balmasova, MD, PhD, DSc, professor, department of infectious diseases and epidemiology of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: immunolab@mail.ru

Emir A. Babaev, junior research associate, department of propedeutic dentistry of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: babaev@mail.ru

Elena N. Nikolaeva, MD, PhD, DSc, professor, department of microbiology, virology, immunology of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: elnikolaeva@bk.ru

Yevgeniy V. Ippolitov, MD, PhD, DSc, professor, head of department of fundamental sciences, research institute of medicine and dentistry of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (495) 609-6700
E-mail: ippo@bk.ru

Elena N. Ilina, DSc in Biology, professor, Deputy Director General for science, head of the department of molecular biology and genetics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine Federal Medical Biological Agency
Address: 19/1 Bol'shaya Pirogovskaya str., Moscow, 119146, Russian Federation
Phone: (499) 245-0471

Aleksandr G. Gabibov, DSc in Chemistry, professor, director of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences
Address: 16/10 Miklukho-Maklaya str., GSP-7, Moscow, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 727-3860
E-mail: gabibov@mx.ibch.ru

НОВОСТИ НАУКИ

Вирусы сотрудничают для преодоления иммунной защиты бактерий

Установлено, что частицы одного типа вируса могут атаковать волнами – сначала ослабляя бактерии, а затем убивая их. Бактерии обладают системами защиты от вирусов типа CRISPR-Cas. Фаги противодействуют этой защите посредством молекул, называемых «анти-CRISPR». Показано, что отдельные вирусные частицы не могут полностью противодействовать CRISPR-Cas самостоятельно, но если достаточное количество частиц присутствует вместе, «совместная работа» позволяет им преодолеть его и создать инфекцию в популяции бактерий.

Количество фаговых частиц, превышающее некий порог, позволяет фагам захватывать бактерии, одновременно или последовательно заражая данную бактерию. Полагают, что два вируса, обладающие молекулами анти-CRISPR, одновременно атакуют одну и ту же бактерию, тем самым объединяя силы для инактивации защиты CRISPR-Cas. Исследователи обнаружили, что, учитывая достаточно большое количество вирусов, присутствующих в окружающей среде, «последовательные инфекции» бактерий приводят к возникновению эпидемии в популяции бактерий.

Первый вирус, вторгающийся в бактерию, частично ослабляет бактериальную иммунную систему с ее анти-CRISPR-молекулами, блокируя некоторые из существующих защит CRISPR-Cas, но не может правильно заразить клетку и в конечном итоге был уничтожается оставшейся активной CRISPR-Cas системой.

Второй вирус затем способен преодолеть остатки CRISPR-Cas с его анти-CRISPR-молекулами и успешно заражает и убивает бактерии.

Фаги могут работать вместе, чтобы отключить бактериальные иммунные системы, и это имеет важные последствия для использования фага для лечения человеческих инфекций, поскольку доза фага, который используется, может определить, способен ли фаг убивать бактерии.

Вирусы могут работать вместе неожиданным образом, когда они могут вызвать внезапные всплески болезни, если их число превышает критические пороговые значения.

*Landsberger M, Gandon S, Meaden S, Rollie C, Chevallereau A, Chabas H, et al.
Anti-CRISPR Phages Cooperate to Overcome CRISPR-Cas Immunity.
Cell. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.058>*

Компонент коричневого масла может помочь в лечении некоторых бактериальных инфекций

Исследование показало, что коричневый альдегид (cinnamaldehyde) разрушал 75,6% биопленок *P. aeruginosa*. В дополнение к этому, CAD также влиял на формирование биопленок и способность бактерий распространяться. Эти результаты определенно способствуют поиску новых противомикробных препаратов.

*Topa SH, Subramoni S, Palombo EA, Kingshott P, et al.
Cinnamaldehyde disrupts biofilm formation and swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*.
Microbiology 2018; DOI 10.1099/mic.0.000692*

Плазмидная криотрансформация вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ

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

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

Проведена оптимизация условий плазмидной криотрансформации вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В экспериментах использовали плазмидный вектор pPMC1, способный автономно реплицироваться в бактериях рода *Francisella*. Показаны необходимость наличия ионов магния в трансформационном буфере и важность использования минимального объема трансформационной смеси при замораживании-оттаивании. Оптимизированный протокол позволяет получать до 1×10^7 трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК, что сравнимо с эффективностью электропорации плазмидной ДНК pPMC1 в клетки туляремийного вакцинного штамма.

Ключевые слова: *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, криотрансформация, оптимизация, фаза роста

Для цитирования: Шишкова Н.А., Вахрамеева Г.М., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А. Плазмидная криотрансформация вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ. Бактериология. 2018; 3(2): 38–42. DOI: 10.20953/2307-6631-2018-2-38-42

Plasmida cryotransformation of vaccin strain *Francisella tularensis* 15 NIEG

N.A.Shishkova, G.M.Vakhrameyeva, V.M.Pavlov, A.N.Mokrievich, I.A.Dyatlov

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

The optimization of the conditions for plasmid cryotransfusion of the vaccine strain *F. tularensis* 15 NIEG was carried out. The plasmid vector pPMC1, which is autonomously replicable in bacteria of the genus *Francisella*, was used in the experiments. Both necessity of the presence of magnesium ions in the transformation buffer and the importance of using the minimum volume of the transformation mixture during freezing-thawing are shown. The optimized protocol allows to obtain up to 1×10^7 transformants per 1 µg of plasmid DNA, which is comparable to the efficiency of the electroporation of pPMC1 plasmid DNA into the cells of the tularemia vaccine strain.

Keywords: *Francisella tularensis* 15 NIEG, cryotransformation, optimization, growth phase

For citation: Shishkova N.A., Vakhrameyeva G.M., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Dyatlov I.A. Plasmida cryotransformation of vaccin strain *Francisella tularensis* 15 NIEG. Bacteriology. 2018; 3(2): 38–42. (In Russian). DOI: 10.20953/2307-6631-2018-2-38-42

Для профилактики туляремии в России используют живую туляремийную вакцину, созданную на основе штамма *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 15 линии НИИЭГ. У вакцинированных людей формируется длительный (не менее 5 лет) иммунитет, защищающий от заражения возбудителем туляремии подвида *holarctica*, циркулирующим на территории Евразии [1]. В литературе имеются сведения о потере протективных свойств вакцинного штамма при хранении и в процессе производства вакцинного препарата [1], а также описаны случаи гиперреакций у людей после иммунизации коммерческой туляремийной вакциной [2]. Поэтому создание живой туляремийной вакцины

с минимальными побочными действиями и стабильно наследуемыми иммуногенными свойствами является актуальной задачей.

Для решения данной проблемы созданы молекулярные инструменты и методики, позволяющие целенаправленно изменять геном вакцинного штамма *F. tularensis* [3]. Генетические структуры в клетки *F. tularensis* вводят, как правило, методом трансформации [4–8], а также методами конъюгации [9] и мобилизации [10]. Известны три варианта трансформации бактерий *F. tularensis* плазмидной ДНК: два общих для вида *F. tularensis* – с помощью электропорации и замораживания-оттаивания, и один химический метод –

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. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0117

E-mail: mokrievich@obolensk.org

Статья поступила 20.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 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 20.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

для подвида *novicida* [11]. По литературным данным, метод электропорации более эффективен по сравнению с методом криотрансформации [12, 13].

Целью настоящей работы являются повышение эффективности криотрансформации вакцинного штамма тулярийного микроба и выявление факторов, влияющих на данный процесс.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и плазмиды. Штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в таблице 1.

Питательные среды и условия культивирования. Штаммы *F. tularensis* выращивали на плотной питательной среде ФТА, содержащей в 1 л: 300 мл готового агара Хоттингера, 6,3 г агара, 10 г высушенной крови крупного рогатого скота, 10 г глюкозы, 0,5 г цистеина, 0,025 г тиамин хлорида, pH 7,2.

Для культивирования бактерий *F. tularensis* в жидкой питательной среде использовали предложенную ранее среду [15] с рядом модификаций (ФТВ) (1 л среды содержал: кислотный гидролизат казеина – 5 г, дрожжевой экстракт – 5 г, калия фосфат однозамещенный – 12 г; калия гидроксид – 3,9 г; натрий хлористый – 10 г; цистеина гидрохлорида моногидрат – 0,1 г, сульфат железа (II) 7-водного – 6 мг, глюкоза – 2 г; pH среды 7,2).

При необходимости в питательные среды добавляли 100 мкг/мл полимиксина В и 3 мкг/мл хлорамфеникола (См).

Культивирование проводили при температуре 37°C. Жидкие культуры растили в колбах или пробирках в термостатируемой качалке GFL 3032 (200 об./мин). Пробирки с культурами находились на платформе в скошенном положении.

Манипуляции с ДНК. Выделение плазмидной ДНК из клеток *F. tularensis* проводили по методике, описанной в работе [16].

Криотрансформация бактерий *F. tularensis* плазмидной ДНК. Для трансформации использовали раствор ДНК pPMC1 с концентрацией 50 мкг/мл в ТЕ-буфере (1 mM ЭДТА, 10 mM трис-буфер, pH 7,5) и трансформационный буфер (ТБ): 0,1 M MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, pH 7,5. pH ТБ доводили с помощью раствора 1 M NaOH.

Бактериальную суспензию для посева готовили следующим образом. Ночную агаровую культуру суспендировали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) (0,15 M натрия хлорида, 0,01 M однозамещенного калия фосфата, 0,015 M двухзамещенного натрия фосфата, pH 7,6) до оптической плотности, соответствующей 10 ЕД стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ НЦЭСМП). 0,2 мл полученной суспензии высевали газонем на чашку Петри диа-

метром 9 см с ФТА и инкубировали при температуре 37°C в течение 20 ч. Выросшую культуру собирали петлей и суспендировали в ФТВ до концентрации сырой биомассы 10 мг/мл.

Для приготовления культуры в вегетативной фазе роста в микробиологическую пробирку с 1,5 мл ФТВ вносили 0,5 мл посевного материала и культивировали на качалке (200 об./мин) при температуре 37°C в течение 2,5 ч. Затем 1 мл культуры отбирали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и клетки осаждали на центрифуге (Centrifuge 5417R, Eppendorf) при 12000 об./мин в течение 3 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость полностью удаляли и осадок ресуспендировали в 20 мкл ТБ.

Для криотрансформации в бактериальную суспензию вносили 2 мкл раствора ДНК pPMC1 (данный объем раствора ДНК был использован во всех экспериментах) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Пробирку с трансформационной суспензией замораживали в жидком азоте в течение 5 мин, после чего прогревали 5 мин при температуре 37°C. К прогретой суспензии добавляли 500 мкл ФТВ, перемешивали и затем пробирку инкубировали в течение 2 ч в термостате при температуре 37°C. Высевы из исходной суспензии и 10-кратных разведений в ЗФР проводили по 0,1 мл на три чашки с плотной питательной средой, содержащей См.

Электропорация бактерий *F. tularensis* плазмидной ДНК. Электропорацию вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ плазмидной ДНК проводили по методике [6] с модификациями: 2,5 мл посевной бактериальной суспензии в концентрации 10 мг/мл ФТВ вносили в колбу объемом 100 мл с 7,5 мл ФТВ и культивировали 2,5 ч на качалке в режиме 200 об./мин при температуре 37°C. Для приготовления 4 образцов для электропорации брали 4 мл подорошенной бактериальной культуры и осаждали на центрифуге (Centrifuge 5417R, Eppendorf) 3 мин, 10 000 об./мин при комнатной температуре. Осадки ресуспендировали в 1 мл 0,5 M сахарозы, осаждали и повторно ресуспендировали в 200 мкл 0,5 M растворе сахарозы. Для электропорации 2 мкл раствора ДНК смешивали с 50 мкл сахарозной суспензии бактерий и переносили в кювету для электропорации с зазором между электродами 1 мм. Электропорацию проводили на приборе «Electroporator 2510» (Eppendorf) при напряжении 1750 В и времени импульса 5 ± 0,5 мсек. После электрического разряда содержимое кюветы переносили в 1,5 мл центрифужную пробирку с 1 мл ФТВ и инкубировали при температуре 37°C в течение 2 ч. Высевы из исходной суспензии и 10-кратных разведений в ЗФР проводили по 0,1 мл на три чашки с плотной питательной средой, содержащей См.

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Название	Характеристика	Источник или ссылка
Штаммы		
<i>F. tularensis</i> 15 линии НИИЭГ	subsp. <i>holarctica</i> , вакцинный штамм	«ГКПМ-Оболенск»*
<i>F. tularensis</i> 15(pPMC1)	штамм 15 НИИЭГ с плазмидой pPMC1, фенотип См ^R	«ГКПМ-Оболенск» [14]
Плазмиды		
pPMC1	Плазмидный вектор на основе репликона pFNL10 размером 4259 п.о., несущий ген <i>cat</i> из плазмиды pC194.	[14]

*Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что для криотрансформации бактерий *F. tularensis* плазмидной ДНК необходимо наличие ионов магния в ТБ, кроме этого, эффективность трансформации повышалась при использовании буфера с щелочными значениями pH [4]. В настоящей работе мы использовали трехкомпонентный буферный раствор, состоящий из ионов магния, сульфата и аммония для поддержания необходимой величины pH. Данный буфер отличался от ранее описанного отсутствием солей трис-ацетата и хлористого калия.

Влияние посевной дозы на компетентность клеток в логарифмической фазе роста

При сравнении компетентности трех выращенных образцов бактериальных культур, полученных после засева в ФТВ ночной агаровой культуры с начальными весовыми концентрациями сырой биомассы: А – 5 мг/мл (что соответствовало концентрации бактериальных клеток 5×10^9 КОЕ/мл), Б – 2,5 мг/мл и В – 1,25 мг/мл, были получены следующие результаты: для образца А – $1,25 \times 10^5$, Б – $3,5 \times 10^5$ и для В – $0,6 \times 10^5$ колоний трансформантов (для приготовления одного образца компетентных клеток использовали 1 мл культуры; в трансформационную смесь вносили 100 нг ДНК pRMC1). Таким образом, посевная доза бактерий *F. tularensis* при подрачивании культуры в ФТВ перед этапом замораживания-оттаивания влияла на эффективность трансформации, и наилучшие результаты были получены для образца Б. Для определения количества трансформантов учитывали результаты подсчета колоний на чашках из разведений, содержащих от 3×10^3 до 3×10^1 бактерий с плазмидой в 1 мл.

При подсчете количества живых бактерий в образце Б на всех этапах проведения эксперимента оказалось, что через 2,5 ч роста количество живых клеток увеличилось с $2,5 \times 10^9$ КОЕ до $6,3 \times 10^9$ КОЕ, а после этапов замораживания-оттаивания и последующего подрачивания в течение 2 ч уменьшилось до $3,85 \times 10^9$ КОЕ. Разброс количества выросших колоний на трех чашках при высеве из одного разведения был менее 15 % от среднеарифметического значения в этой и последующих сериях экспериментов.

Эффективность криотрансформации для образца Б в пересчете на 1 мкг плазмиды pRMC1 составила $5,6 \times 10^{-4}$ от числа колоний, выросших на чашках в отсутствие селективного давления.

Оптимизация объема и состава трансформационной смеси

Было приготовлено 10 мл бактериальной культуры, подращенной в колбе объемом 100 мл после засева ночной агаровой культурой в весовой концентрации 2,5 мг/мл. Затем из колбы отбирали по 1 мл культуры в 5 пластиковых конических пробирок объемом 1,5 мл и клетки осаждали. Три осадка (I–III) ресуспендировали в 20, 40 и 80 мкл ТБ, а два осадка (IV и V) – в 20 мкл 0,1 М раствора хлористого калия и в 20 мкл ФТВ соответственно. Кроме этого, была приготовлена бактериальная суспензия (VI) в 80 мкл ТБ из 4 мл культуры. В образец VI вносили 8 мкл плазмидной ДНК, тогда как в остальные образцы – по 2 мкл. Образцы I–V

Таблица 2. Влияние объема трансформационной смеси на количество трансформантов

№ п/п	Объем трансформационной смеси, мкл	Количество трансформантов, $\times 10^5$
I	20	8,4
II	40	4,1
III	80	0,6

Таблица 3. Влияние аэрации на выход трансформантов

Условия предварительного выращивания	Количество трансформантов, $\times 10^5$
С аэрацией в течение 2,5 час	7,5
Без подрачивания	0,007

после криотрансформации подрачивали в 0,5 мл ФТВ, а образец VI – в 2 мл ФТВ и высевали на селективные чашки. Результаты эксперимента для образцов I–III приведены в таблице 2.

Увеличение объема трансформационной смеси с 20 до 80 мкл негативно повлияло на эффективность криотрансформации.

Замена в трансформационной среде сернокислого магния на хлористый калий (образец IV) приводила к снижению количества трансформантов с $8,4 \times 10^5$ до $0,64 \times 10^5$, а использование ФТВ (образец V) вместо раствора ТБ приводило также к уменьшению эффективности криотрансформации с $8,4 \times 10^5$ до $0,66 \times 10^5$. Таким образом, полученные данные подтверждают ранее сделанный вывод о необходимости использования высокой концентрации ионов магния в трансформационной смеси [4].

Увеличение количества бактерий с $6,3 \times 10^9$ кл (образец I) до $2,5 \times 10^{10}$ кл (образец VI) и вносимой ДНК с 0,1 мкг до 0,4 мкг в 80 мкл ТБ не привело к пропорциональному увеличению количества трансформантов. Было получено $6,8 \times 10^5$ колоний в варианте VI, тогда как в варианте I – $9,4 \times 10^5$ колоний, что превышало количество трансформантов с использованием 80 мкл бактериальной суспензии. Данный результат указывает на необходимость проведения этапа замораживания-оттаивания в минимальном объеме. Не обнаружено существенного отличия в снижении выживаемости для образцов I и VI после замораживания-оттаивания: I – $4,9 \times 10^9$ КОЕ, а VI – $2,2 \times 10^{10}$ КОЕ.

Влияние фазы роста бактерий на эффективность криотрансформации

Для выяснения этого вопроса были приготовлены два образца бактериальной культуры в пробирках: засеянная культура подрачивалась с аэрацией (образец I); использовали для криотрансформации культуру без подрачивания (образец II). В обоих случаях посевным материалом служила ночная агаровая культура с дозой засева 2,5 мг/мл. Результаты криотрансформации этих вариантов культур приведены в таблице 3.

Из таблицы 3 следует, что компетентность бактерий возникла в вегетативно-активной фазе роста культуры в ФТВ.

Зависимость количества трансформантов от массы вносимой плазмидной ДНК

Количество вносимой ДНК в трансформационную смесь коррелировало с числом получаемых трансформантов (табл. 4).

Таблица 4. Влияние количества вносимой ДНК на выход трансформантов

Масса ДНК в трансформационной смеси, нг	Количество трансформантов, $\times 10^5$
1	0,81
10	8,3
100	94

Из таблицы 4 следует, что линейная зависимость количества получаемых трансформантов от количества внесенной в трансформационную смесь ДНК сохраняется как минимум в диапазоне от 1 нг до 100 нг. Насыщающий уровень количества ДНК для образца компетентных клеток, содержащих $6,3 \times 10^9$ КОЕ, превышает 100 нг.

При использовании для трансформации плазмидной ДНК, предварительно проинкубированной с ДНК-лигазой (1 ед активности) в лигазном буфере (10 mM $MgCl_2$, 10 mM диэтилтреитола, 0,5 mM ATP, 40 mM Tris•HCl, pH 7,8), эффективность криотрансформации снижалась до 1×10^5 колоний, тогда как то же количество плазмидной ДНК в ТЕ-буфере приводило к появлению $9,4 \times 10^5$ трансформантов.

Критичным компонентом в составе буфера для криотрансформации в предлагаемом варианте являются ионы магния. В литературе описан протокол проведения криотрансформации бактерии *F. novicida* и представителей других подвидов *F. tularensis* с использованием 0,1 М раствора хлористого кальция и 10 mM хлористого рубидия в трансформационном буфере [17–20]. Таким образом, можно сделать предположение о взаимозаменяемости щелочноземельных ионов в процессе криотрансформации. Кальциевый вариант в 3–10 раз менее эффективен, чем метод электропорации [11, 13].

Предлагаемый нами вариант криотрансформации, в отличие от варианта с использованием хлористого кальция, сравним по эффективности с электропорацией. Однако препарат ДНК для электропорации должен обладать низкой электропроводностью. Это требование исключает использование препаратов ДНК, взятых непосредственно из реакционной смеси после лигирования. В случае криотрансформации данное условие не является обязательным. Использование неочищенного препарата ДНК в составе трансформационного буфера приводило к снижению эффективности трансформации в 10 раз по сравнению с обессоленным и очищенным препаратом ДНК. Тем не менее в этом случае возможно получить довольно представительную популяцию трансформантов (порядка 1×10^5 трансформантов на 0,1 мкг ДНК).

Предложенный вариант криотрансформации позволяет получать до 1×10^7 трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК. Сравнение удельной эффективности на 1 мкг одного и того же препарата плазмидной ДНК методов криотрансформации и электропорации в клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ показало их подобность, что указывает на возможность взаимозаменяемости этих подходов в большинстве случаев.

Уменьшение объема трансформационной смеси, использованной для замораживания-оттаивания, приводит к увеличению эффективности криотрансформации. Данное наблюдение, вероятно, указывает на необходимость краткого временного интервала перехода клеток (их мембран) из обычного состояния в замороженное и обратно.

Компетентность клеток *F. tularensis* зависит от фазы роста культуры. Так, ночная агаровая культура обладает на три порядка меньшей компетентностью по сравнению с культурой, подрощенной в ФТВ в течение времени, достаточного для одного клеточного цикла деления. Данное наблюдение может указывать на отличие структуры клеточных стенок у покоящихся и делящихся клеток *F. tularensis*.

Проведенные исследования позволили оптимизировать условия криотрансформации плазмидных ДНК в клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Финансирование

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

Литература

- Олсуфьев НГ. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина, 1975, 192 с.
- Медуницын НВ. Вакцинология. М.: Триада-Х, 1999, 272 с.
- Павлов ВМ, Дятлов ИА. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение. М., 2012, 267 с.
- Мокриевич АН, Фурсов ВВ, Павлов ВМ. Криотрансформация туляремии микроба плазмидной ДНК. Проблемы особо опасных инфекций. 1994;4:186-90.
- Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Volkovoy K. Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like F6168: The base of plasmid vectors for *Francisella tularensis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996 Mar;13(3):253-56
- Pomerantsev AP, Golovliov IR, Ohara Y, Mokrievich AN, Obuchi M, Norqvist A, et al. Genetic organization of the *Francisella* plasmid pFNL10. Plasmid. 2001 Nov;46(3):210-22. DOI: 10.1006/plas.2001.1548
- Norqvist A, Kuoppa K, Sandstrom G. Construction of a shuttle vector for use in *Francisella tularensis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996 Mar;13(3):257-60.
- 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.
- Мокриевич АН, Шишкова НА, Дятлов ИА, Павлов ВМ. Особенности конъюгативного переноса плазмиды pSa между *Escherichia coli* и *Francisella tularensis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;2:80-2.
- Golovliov I, Sjostedt A, Mokrievich A, Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. FEMS Microbiol Lett. 2003 May 28;222(2):273-80.
- Zogaj X, Klose KE. Genetic manipulation of *Francisella tularensis*. Front Microbiol. 2011 Jan 5;1:142. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00142.
- LoVullo ED, Sherrill LA, Perez LL, Pavelka MS. Genetic tools for highly pathogenic *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. Microbiology. 2006 Nov;152(Pt 11):3425-35. DOI: 10.1099/mic.0.29121-0
- Le Pihive E, Blaha D, Chenavas S, Thibault F, Vidal D, Valade E. Description of two new plasmids isolated from *Francisella philomiragia* strains and construction of shuttle vectors for the study of *Francisella tularensis*. Plasmid. 2009; 62:147–157. DOI: 10.1016/j.plasmid.2009.07.001
- Кравченко ТБ, Платонов МЕ, Вахрамеева ГМ, Баннов ВА, Кудрявцева ТЮ, Мокриевич АН, Павлов ВМ. Клонирование и экспрессия протективных антигенов *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B и ESAT-6 в клетках *Francisella tularensis* 15/10. Биохимия. 2007;72(7):905-14.

15. 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.
16. Павлов ВМ, Родионова ИВ, Мокриевич АН, Мещерякова ИС. Выделение и молекулярно-генетическая характеристика криптической плазмиды из штамма *Francisella novicida* like F6168. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1994;3:39-40.
17. Liu J, Zogaj X, Barker JR, Klose KE. Construction of targeted insertion mutations in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. Biotechniques. 2007 Oct;43(4):487-90, 492. DOI: 10.2144/000112574
18. Rodriguez SA, Yu JJ, Davis G, Arulanandam BP, Klose KE. Targeted inactivation of *Francisella tularensis* genes by group II introns. Appl Environ Microbiol. 2008 May;74(9):2619-26. DOI: 10.1128/AEM.02905-07.
19. Zogaj X, Chakraborty S, Liu J, Thanassi DG, Klose KE. Characterization of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida* type IV pilus. Microbiology. 2008 Jul;154(Pt 7):2139-50. DOI: 10.1099/mic.0.2008/018077-0.
20. Barker JR, Chong A, Wehrly TD, Yu JJ, Rodriguez SA, Liu J, et al. The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. Mol Microbiol. 2009 Dec;74(6):1459-70.
14. Kravchenko TB, Platonov ME, Vahrameeva GM, Bannov VA, Kudryavtseva TJu, Mokrievich AN, Pavlov VM. Cloning and expression of protective antigens of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B and ESAT-6 in *Francisella tularensis* 15/10. Biochemistry (Moscow). 2007;72(7):905-14.
15. Lapin AA, Pavlov VM, Mokrievich AN, Domotenko LV, Khramov MV. Simple Liquid Nutrient Medium for Molecular Genetic Investigations of *Francisella tularensis*. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2009;4(102):66-7. (In Russian).
16. Pavlov VM, Rodionova IV, Mokrievich AN, Meshcheryakova IS. Isolation and molecular genetic characterization of a cryptic plasmid from the strain *Francisella novicida* like F6168. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 1994;3:39-40. (In Russian).
17. Liu J, Zogaj X, Barker JR, Klose KE. Construction of targeted insertion mutations in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. Biotechniques. 2007 Oct;43(4):487-90, 492. DOI: 10.2144/000112574
18. Rodriguez SA, Yu JJ, Davis G, Arulanandam BP, Klose KE. Targeted inactivation of *Francisella tularensis* genes by group II introns. Appl Environ Microbiol. 2008 May;74(9):2619-26. DOI: 10.1128/AEM.02905-07.
19. Zogaj X, Chakraborty S, Liu J, Thanassi DG, Klose KE. Characterization of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida* type IV pilus. Microbiology. 2008 Jul; 154(Pt 7):2139-50. DOI: 10.1099/mic.0.2008/018077-0.
20. Barker JR, Chong A, Wehrly TD, Yu JJ, Rodriguez SA, Liu J, et al. The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. Mol Microbiol. 2009 Dec;74(6):1459-70.

References

1. Olsuf'ev NG. Taksonomiya, mikrobiologiya i laboratornaya diagnostika vzbuditelya tulyaremiy [Taxonomy, microbiology and laboratory diagnosis of the causative agent of tularemia]. Moscow: "Meditsina" Publ., 1975, 192 p. (In Russian).
2. Medunitsyn NV. Vaktsinologiya [Vaccinology]. Moscow: "Triada-Kh", 1999, 272 p. (In Russian).
3. Pavlov VM, Dyatlov IA. Molekulyarno-geneticheskie issledovaniya bakterii roda *Francisella* i ikh prikladnoe znachenie [Molecular-genetic studies of bacteria of the genus *Francisella* and their application value]. Moscow, 2012, 267 p. (In Russian).
4. Mokrievich AN, Fursov VV, Pavlov VM. Plasmid cryotransformation of *Francisella tularensis*. Problems of Particularly Dangerous Infections. 1994;4:186-90. (In Russian).
5. Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Volkovoy K. Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like F6168: The base of plasmid vectors for *Francisella tularensis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996 Mar;13(3):253-56
6. Pomerantsev AP, Golovliov IR, Ohara Y, Mokrievich AN, Obuchi M, Norqvist A, et al. Genetic organization of the *Francisella plasmid* pFNL10. Plasmid. 2001 Nov;46(3):210-22. DOI: 10.1006/plas.2001.1548
7. Norqvist A, Kuoppa K, Sandstrom G. Construction of a shuttle vector for use in *Francisella tularensis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996 Mar;13(3):257-60.
8. 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.
9. Mokrievich AN, Shishkova NA, Dyatlov IA, Pavlov VM. Peculiarities of the Conjugative pSa Plasmid Transfer from *Escherichia coli* into *Francisella tularensis*. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2013;2:80-2. (In Russian).
10. Golovliov I, Sjostedt A, Mokrievich A, Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. FEMS Microbiol Lett. 2003 May 28;222(2):273-80.
11. Zogaj X, Klose KE. Genetic manipulation of *Francisella tularensis*. Front Microbiol. 2011 Jan 5;1:142. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00142.
12. LoVullo ED, Sherrill LA, Perez LL, Pavelka MS. Genetic tools for highly pathogenic *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. Microbiology. 2006 Nov;152(Pt 11):3425-35. DOI: 10.1099/mic.0.29121-0
13. Le Pihive E, Blaha D, Chenavas S, Thibault F, Vidal D, Valade E. Description of two new plasmids isolated from *Francisella philomiragia* strains and construction of shuttle vectors for the study of *Francisella tularensis*. Plasmid. 2009; 62:147–157. DOI: 10.1016/j.plasmid.2009.07.001

Информация о соавторах:

Шишкова Нина Андреевна, кандидат биологических наук, ведущий 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

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

Павлов Виталий Михайлович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

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 co-authors:

Nina A. Shishkova, PhD (Biol), leading 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. 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

Vitaliy M. Pavlov, PhD, DSc (Biol), 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

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

Применение рекомбинантного аттенуированного штамма MVA вируса вакцины в качестве векторной вакцины для иммунизации против туберкулеза

Д.И.Павельев, Л.Ф.Стовба, М.Н.Писцов, В.Н.Лебедев, С.В.Борисевич

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад-6, Российская Федерация

Необходимость получения новой вакцины против туберкулеза обусловлена тем, что применяемая на протяжении последних 90 лет вакцина Кальметта–Гирена (BCG) вызывает умеренную защиту против распространения милиарного и диссеминированного туберкулеза у детей, однако она не в состоянии защитить взрослое население от заражения *Mycobacterium tuberculosis*, и тем более ее нельзя применять для больных СПИДом.

В настоящее время большое внимание уделяется созданию векторных вакцин против возбудителей бактериальной и вирусной природы. На основе высокоаттенуированного штамма MVA вируса вакцины была сконструирована вакцина MVA85A, в геном которой встроены гены иммунодоминантного белка *Mycobacterium tuberculosis* – 85A. Во всех клинических экспериментах эта вакцина применялась в качестве бустерной при праймировании вакциной Кальметта–Гирена. На здоровых взрослых волонтерах, пациентах, больных СПИДом и с латентной формой туберкулеза, подростках и детях была показана ее безопасность при различных способах применения (внутрикожном, внутримышечном и аэрозольном) и разных дозах. Вакцина индуцировала Т-клеточный иммунный ответ, однако не защищала от дальнейшего заражения туберкулезом. Это явилось стимулом для создания мультивалентных вакцин, экспрессирующих основные эпитопы антигенов возбудителя туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, штамм MVA вируса вакцины, праймирование, бустеризация, иммунодоминантные белки, иммунный ответ, аттенуированный штамм

Для цитирования: Павельев Д.И., Стовба Л.Ф., Писцов М.Н., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Применение рекомбинантного аттенуированного штамма MVA вируса вакцины в качестве векторной вакцины для иммунизации против туберкулеза. Бактериология. 2018; 3(2): 43–50. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-43-50

Use of the recombinant attenuated MVA strain of the vaccine virus as a vector vaccine for immunization against tuberculosis

D.I.Pavelev, L.F.Stovba, M.N.Pistcov, V.N.Lebedev, S.V.Borisevich

48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of the Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad-6, Russian Federation

The used for 90 years Calmett–Giren vaccine (BCG) is alone accessible licensed vaccine against tuberculosis. It causes moderate not long duration protection of children against tuberculosis and is impossible to protect of adult against *Mycobacterium tuberculosis* invasion. It is conditioned the necessity of generation of novelty vaccines.

In present time the great attention is spared of creature of novelty vector recombinant vaccines, based on highly attenuated strain MVA of vaccine virus. The vaccine MVA85, that contains the gene of immunodominant protein *Mycobacterium tuberculosis* 85A, is constructed. In everybody clinical experiments this vaccine was used for busting with the BCG for priming/its safety and possibility to form of T-cell immune reply was shown on adult volunteers. Its effect by intramuscular, subcutaneous and aerosol routes of immunization is evaluated. The vaccine was safe for children, adult and AIDs patients and caused of specific T-cell immune reply, but don't protects from following invasion of *Mycobacterium tuberculosis*. It stimulates the creature of multivalent vaccine, containing the major epitopes of antigens of tuberculosis agent.

Keywords: tuberculosis, MVA strain of vaccinia virus, prime immunization, buster immunization, immunodominant proteins, immune response, attenuated strain

For citation: Pavelev D.I., Stovba L.F., Pistcov M.N., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Use of the recombinant attenuated MVA strain of the vaccine virus as a vector vaccine for immunization against tuberculosis. Bacteriology. 2018; 3(2): 43–50. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-43-50

Для корреспонденции:

Борисевич Сергей Владимирович, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, начальник ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации

Адрес: 141306, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

Статья поступила 24.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

Sergey V. Borisevich, Doctor of Science (Biology), professor, corresponding fellow of RAS, head «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of the Defense of the Russian Federation

Address: 11 Oktyabrskaya str., Moscow region, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

The article was received 24.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

Туберкулез является социально значимой инфекцией. Ежегодно регистрируется около 9 млн новых случаев заболевания, а 1,5 млн человек умирают от этой болезни [1, 2].

Этиологическим агентом туберкулеза является *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Этим возбудителем инфицировано около 30% населения Земли, а в странах Азии и Западной Африки туберкулез является эндемичным заболеванием [3]. *M. tuberculosis* распространяется аэрозольным путем. Заболевание затрагивает в основном легкие, но иногда и другие органы: селезенку, желудок, кишечник, мозг. Инфицирование человека приводит как к активной форме заболевания, так и, в большинстве случаев, к латентной. В 10% случаев латентная инфекция реактивируется в течение жизни. Коинфицирование вирусом иммунодефицита человека, который эндемичен на тех же территориях, что и *M. tuberculosis*, повышает риск реактивации латентной инфекции. Этой реактивации также подвержены люди с генетической дефицитностью интерферона- γ (IFN- γ) и пациенты, получавшие блокирующую терапию против фактора некроза опухолей- α (TNF- α) [2, 4].

Для решения проблемы ограничения или полной ликвидации распространения этого социально значимого заболевания разрабатываются новые препараты для вакцинации и новые режимы вакцинации [5–8].

В связи со снижением противоопухолевого популяционного иммунитета свойства вируса вакцины (ВВ) делают его идеальным кандидатом для использования в качестве вектора при создании векторных вакцин. Преимущества ВВ как вектора, впервые описанные Moss и Paoletti в 1982 г. [9, 10], следующие: широкий круг хозяев вектора, позволяющий рекомбинантному гену экспрессировать в клетках животных и птиц, быстрая наработка рекомбинантного белка при высокой множественности инфицирования, различные природные и синтетические промоторы позволяют осуществлять высокие уровни экспрессии чужеродного белка [11]; высокомолекулярный геном позволяет встроить до 25 тыс. п. о. чужеродной ДНК, в том числе и гены цитокинов, модулирующих иммунный ответ [12]; транзистентная природа ВВ-экспрессирующей системы обходит проблемы трансформации клеточных линий; функциональное картирование генома позво-

лило определить более 10 сайтов для встраивания чужеродной ДНК [13]; цитоплазматическая ВВ-транскрипционная машина позволяет избежать сложностей, ассоциированных с регуляцией экспорта несплайсированных РНК в ядра, что характерно для некоторых белков (например, структурных белков лентивируса приматов); стимуляция гуморального и клеточного иммунитета [11].

Основными недостатками ВВ в качестве рекомбинантной вакцины являются низкая эффективность его повторного использования, потенциальная реактогенность самого векторного вируса и возможность диссоциации у иммунокомпromиссных лиц [14]. Поэтому для вакцинации предлагается применять аттенуированные штаммы.

Одним из наиболее аттенуированных штаммов ВВ является штамм MVA (modified vaccinia Ankara), который был получен после пассирования на фибробластах куриных эмбрионов родительского штамма Анкара, что привело к потере 15% генома исходного штамма вируса [15]. Результатом множественных делеций является возможность интеграции в геном вируса большого объема чужеродной информации.

Проведенные недавно клинические испытания подтвердили его исключительную безопасность для человека (табл. 1) [16].

Исследования последних лет показали, что уровни гуморального и клеточного иммунитета могут быть значительно увеличены при применении комбинированных вакцин в режиме гетерологичного праймирования/бустирования (табл. 2) [17, 18]. Такая стратегия вакцинирования увеличивает степень напряженности и специфичность Т-клеточного иммунитета и способствует формированию Т-клеточной памяти.

Основной подход специфической профилактики туберкулеза в настоящее время состоит в том, что праймирование проводится вакциной BCG (bacilli Calmette-Guerin), а бустирование – рекомбинантным MVA-штаммом, экспрессирующим иммунодоминантный белок 85A *M. tuberculosis* (MVA85A) [17, 19]. Важно отметить, что штамм MVA85A сам индуцирует высокие уровни 85A специфических CD4⁺ клеток у BCG вакцинированных субъектов [20].

После исследований по оценке эффективности вакцины MVA85A на животных были проведены ее клинические ис-

Таблица 1. Место, сроки и количество волонтеров, возраст и их медицинский статус, а также метод введения экспериментальных образцов вакцин MVA85A, экспрессирующих иммунодоминантный антиген 85A, против туберкулеза

Место проведения	Сроки проведения	Количество волонтеров, человек	Возраст волонтеров, лет	Медицинский статус волонтеров	Метод введения	Источник литературы
1	2	3	4	5	6	7
Кейптаун (Южная Африка)	сентябрь 2005 г.– июнь 2006 г.	24	18–50	Здоровые	в/к	[19]
Великобритания	10 ноября 2011 г.– 1 ноября 2012 г.	24	18–55	Здоровые	в/к, в/м	[13]
Кейптаун (Южная Африка), Дакар (Сенегал)	4 августа 2011 г.– 24 апреля 2013 г.	1233	18–50	Больные СПИДом без явных признаков туберкулеза	в/к	[17]
Ворчестер вблизи Кейптауна (Южная Африка)	Н.д.	48	18–50	Инфицированные <i>M. tuberculosis</i> w/или ВИЧ		[18]
Ворчестер вблизи Кейптауна (Южная Африка)	Н.д.	12 подростков и 24 ребенка	Н.д.	Здоровые		[20]
Ворчестер вблизи Кейптауна (Южная Африка)	Н.д.	144 ребенка	5–12 мес			[16]
Сельский район вблизи Кейптауна (Южная Африка)	июнь 2009 г.– май 2011 г.	2797 детей	3–37 мес			[14]
в/к – внутрикожно, в/м – внутримышечно, Н.д. – нет данных.						

пытания (между сентябрем 2005 г. и июнем 2006 г.) на волонтерах в возрасте 18–50 лет (средний возраст 35,5 года) в Южной Африке вблизи Кейптауна, где туберкулез является эндемичным заболеванием. У волонтеров не было признаков активного туберкулеза, не выявлялось инфицирования ВИЧ-1 и *M. tuberculosis* [22]. Все они ранее были привиты вакциной BCG. Вакцину MVA85A инъецировали внутрикожно (в/к) в дозе 5×10^7 бляшкообразующих единиц (БОЕ).

В течение всего срока наблюдения (1 год) у волонтеров не наблюдалось сильно выраженных побочных явлений, связанных с иммунизацией. Местная реакция на прививку проявлялась в припухлости, покраснении, зуде, легком раздражении, ограничении в движении рукой, покраснении в месте инъекции вакцины, которые исчезали через неделю. Общая реакция заключалась в недомогании, усталости, в легкой лихорадке, артралгии, головной боли, миалгии, тошноте, которые проходили через 7 дней после иммунизации.

Таблица 2. Результаты изучения реактогенности и иммуногенности экспериментальных образцов вакцин MVA85A, экспрессирующих иммунодоминантный антиген 85A возбудителя туберкулеза

Иммунизирующая доза, БОЕ	Реактогенность				Иммунный ответ к экспрессирующим генам		Источник литературы
	местная реакция, %		общая реакция, %		гуморальный	клеточный	
$5,0 \times 10^7$	припухлость в месте введения	96	недомогание	33	Наличие Т-клеток, экспрессирующих IFN- γ	Наличие CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-клеток	[19]
	зуд	50	утомляемость	33			
	легкое раздражение	50	легкая лихорадка	46			
	ограниченность движения рукой	13	артралгия	33			
	болезненность	38	головная боль	54			
	покраснение	71	миалгия	13			
	–	–	тошнота	9			
$5,0 \times 10^8$	болезненность в месте введения	Н.д.	усталость	67	Наличие сывороточного IgG к 85A с более высоким уровнем при в/к иммунизации	Регистрация значительных количеств IFN- γ , TNF- α , рецепторов цитокинов при обоих способах иммунизации	[13]
	эритема	Н.д.	головная боль	46			
	припухлость – меньше при в/м введении	Н.д.	недомогание	38			
$1,0 \times 10^7$	При аэрозольном применении – легкие побочные реакции на уровне плацебо	Н.д.	При аэрозольном применении: возбуждение	8	При аэрозольном и в/к применении наличие анти-MVAIgG, анти-MVAIgM, анти-MVAIgA Т-клеток, экспрессирующие MVA85A IFN- γ	При аэрозольном применении – наличие Ag 85A – специфических CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-клеток. Наличие MVA CD4 $^{+}$ и MVA CD8 $^{+}$ Т-клеток	[10]
			утомление	42			
			головная боль	42			
			тошнота и рвота	8			
	При в/к – эритема, припухлость в месте вакцинации	Н.д.	При в/к применении лихорадка	8			
			возбуждение	8			
			артралгия	8			
			миалгия	17			
			утомление	50			
			головная боль	42			
$1,0 \times 10^8$	Локальные поражения в месте введения, мягкие гриппоподобные симптомы, региональная лимфаденопатия	Н.д.	Туберкулезный менингит	1	Наличие незначительного Ag 85A-специфического	Наличие 85A-специфических CD4 $^{+}$ Т-клеточных, представленных в виде IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-17 цитокинов, незначительных CD8 $^{+}$ Т-клеточных	[17]
$5,0 \times 10^7$	припухлость	100	миалгия	15	Н.д.	Наличие MVA85A-индуцированных CD4 $^{+}$ Т-клеточных, представленных IFN- γ , TNF- α , IL-12 цитокинами и CD8 $^{+}$ полифункциональными Т-клетками	[18]
	шелушение	79	усталость	13			
	болезненность	48	недомогание	15			
	легкое раздражение	45	головная боль	27			
	зуд	81	–	–			
$5,0 \times 10^7$	покраснение	100	–	–	Н.д.	Наличие CD4 $^{+}$ Т-клеток, экспрессирующих IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-17 цитокины у детей и подростков; у детей – дополнительно GM-CSF	[20]
	у подростков кожные поражения в месте введения вакцины	Н.д.	средней тяжести инфекции верхних дыхательных путей	13,4			
	У детей: мягкие	96	ложные позывы	6,25			
	средние	2,7	–	–			
	тяжелые	1	–	–			

Таблица 2. Окончание

Иммунизирующая доза, БОЕ	Реактогенность				Иммунный ответ к экспрессирующим генам		Источник литературы
	местная реакция, %		общая реакция, %		гуморальный	клеточный	
2,5 × 10 ⁷ , 5,0 × 10 ⁷ , 1,0 × 10 ⁸	краснота	94,4 (2,5 × 10 ⁷)	недомогание	2,8 (2,5 × 10 ⁷)	Н.д.	Н.д.	[16]
		100 (5 × 10 ⁷)		2,8 (5 × 10 ⁷)			
		100 (1 × 10 ⁸)		11,1 (1 × 10 ⁸)			
	припухлость	94,4 (2,5 × 10 ⁷)	вялость	2,8 (2,5 × 10 ⁷)			
		100 (5 × 10 ⁷)		2,8 (1 × 10 ⁸)			
		100 (1 × 10 ⁸)		11,1 (1 × 10 ⁸)			
	болезненность	8,3 (2,5 × 10 ⁷)	тактильная лихорадка	11 (2,5 × 10 ⁷)			
		13,9 (5 × 10 ⁷)		19,4 (5 × 10 ⁷)			
		22,2 (1 × 10 ⁸)		19,4 (1 × 10 ⁸)			
	легкое раздражение	5,6 (2,5 × 10 ⁷)	температура >37,5°C	8,3 (2,5 × 10 ⁷)			
		5,6 (5 × 10 ⁷)		11,1 (2,5 × 10 ⁷)			
		8,3 (1 × 10 ⁸)		16,7 (1 × 10 ⁸)			
	шелушение	22,2 (2,5 × 10 ⁷)	рвота	5,6 (2,5 × 10 ⁷)			
		44,4 (5 × 10 ⁷)		0 (5 × 10 ⁷)			
		63,9 (1 × 10 ⁸)		11,1 (1 × 10 ⁸)			
1,0 × 10 ⁸	По одной реакции	89	По одной реакции	80	Н.д.	Наличие Ag 85A-специфических CD4 ⁺ клеточных, представленных IFN-γ, TNF-α, IL-12, IL-17 цитокинами	[14]

*В обеих группах, которым вводили внутрикожно и внутримышечно экспериментальные образцы вакцин, уровни общих реакций одинаковые; Н.д. – нет данных.

Иммунизация индуцировала экспрессию IFN-γ, TNF-α, интерлейкина-2 (IL-2), IL-17 цитокинов CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, количество которых превышало базовый уровень, наблюдаемый до иммунизации, вызванный прививкой BCG. Пик Т-клеточного иммунного ответа приходился на 7-е сутки после бустерной иммунизации и сохранялся 364 дня, т.е. в течение всего срока наблюдения. Гуморальный иммунный ответ, определенный в ИФА с использованием метода отпечатков, показал наличие 85А-специфических клеток, экспрессирующих IFN-γ. Результаты настоящего испытания показали, что вакцина может быть рекомендована для иммунизации взрослого населения в эндемичных по туберкулезу районах.

В 2009 г. в Великобритании вакцину MVA85A (№ 010507) использовали в качестве бустерной для сравнительной оценки в/к и внутримышечного (в/м) способов иммунизации в фазе 1 клинических испытаний (регистрационный № NCT1181856). Все волонтеры (24 человека в возрасте 18–55 лет) были предварительно вакцинированы BCG вакциной (прайм-иммунизация) по крайней мере за 6 мес до начала эксперимента. Все они были здоровы и имели отрицательные результаты по инфицированию вирусами гепатита В, С и ВИЧ, также у них не было обнаружено латентной туберкулезной инфекции. Волонтеры были рандомизированно поделены на 2 группы (1 : 1). Волонтеров группы А иммунизировали в/м дозой 1 × 10⁸ БОЕ MVA85A, группы В – той же дозой в/к [23].

Все испытуемые хорошо перенесли иммунизацию, за исключением одного человека, у которого наблюдалось повышение температуры до 37,5°C в течение первых 29 ч. Серьезных побочных явлений, связанных с вакцинацией, не наблюдалось в обеих группах. Клинически значимых различий в симптомах не было в обеих группах.

Исследование не выявило различий в клеточной иммуногенности при этих способах заражения. Оба способа иммунизации генерировали сильный Ag85A-специфический им-

мунный ответ и индуцировали полифункциональные CD4⁺ Т-клетки и рецепторы цитокинов. Пиковые значения IFN-γ наблюдались к 7-м суткам, причем более высокие при в/к способе введения, однако к 24 нед различий между группами не выявлено. Гуморальный иммунный ответ к Ag85A оценивался на 0, 2 и 24-й неделе после иммунизации. Волонтеры, иммунизированные в/к, имели более высокий уровень IgG антител. Однако достоверность этих данных не подтверждена статистически из-за небольшого числа испытуемых.

Поскольку заражение туберкулезом происходит аэрозольным путем при вдыхании инфицированного аэрозоля, возникла необходимость его изучения, так как доставка противотуберкулезной вакцины на слизистую оболочку респираторного тракта может повысить локальный иммунный ответ непосредственно на месте инфицирования. Кроме того, ранее было выявлено, что рекомбинантный MVA вектор, амплифицируемый на слизистую оболочку, индуцирует высокие уровни мукозального иммунитета у лабораторных животных [24].

С 10 ноября 2011 г. по 1 ноября 2012 гг. в Великобритании были проведены клинические эксперименты (фаза 1) по аэрогенной иммунизации вакциной MVA85A 24 волонтеров в возрасте 18–50 лет. Все они были здоровы, у них установлено отсутствие инфицирования вирусами гепатита В, С и ВИЧ, также у них не было обнаружено латентной туберкулезной инфекции. Все были предварительно вакцинированы BCG вакциной (прайм-иммунизация) по крайней мере за 6 мес до начала эксперимента. Волонтеры рандомизированно были поделены на 2 группы (1:1). Волонтеров группы иммунизировали дозой 1 × 10⁷ БОЕ MVA85A аэрозольным способом, группы В – той же дозой в/к [25].

Результаты наблюдений за обеими группами испытуемых свидетельствуют об отсутствии значительных побочных явлений, спровоцированных самим фактом иммунизации, на 7-е и 84-е сутки после иммунизации. Оба способа иммунизации индуцировали CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные отве-

ты, при этом CD4⁺ клеточный ответ был выше в группе с аэрозольной иммунизацией. Величина CD8⁺ клеточного ответа не различалась между группами. Оба способа иммунизации индуцировали образование CD4⁺ Т-клеточных цитокинов: IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-17, однако интенсивность их образования была больше у лиц при аэрозольной иммунизации.

Анти-MVAIgG титры, определяемые на 14, 28, 84 и 168-е сутки, были значительно выше в группе лиц, иммунизированных в/к. Анти-MVAIgA титры, определяемые на 14-е сутки, были также выше при в/к иммунизации. Количество анти-MVAIgM не различалось между двумя группами. Хотя MVA специфический клеточный ответ был определен в обеих группах, титр сывороточных антител к самому вирусному вектору был больше во второй группе при в/к иммунизации.

Следовательно, в фазе 1 клинических испытаний показано, что аэрозольный способ бустерной иммунизации MVA85A является безопасным и способен вызвать формирование выраженного гуморального и Т-клеточного иммунного ответов.

Как упоминалось ранее, людей с иммунодефицитными состояниями нельзя иммунизировать BCG вакциной. Поэтому результаты клинических испытаний по иммунизации вакциной MVA85A волонтеров, больных СПИДом, представляют особый интерес [2].

Испытания проводились в Кейптауне, Южная Африка, и в Дакаре, Сенегал, в период с 4 августа 2011 г. по 24 апреля 2013 г. Для испытания в фазе 2 было отобрано 1233 волонтера, инфицированных ВИЧ-1, в возрасте 18–50 лет, без явных признаков туберкулеза, с содержанием CD4 более 350 клеток/мкл у лиц, ранее никогда не получавших антиретровирусную терапию, и более 300 клеток/мкл – получавших антиретровирусную терапию. Критерием отбора для проведения испытаний лиц с латентной формой туберкулеза являлся не менее чем пятимесячный интервал после завершения курса приема изониазида.

Волонтеры были рандомизированно разделены на 2 группы, без учета их статуса ВИЧ-инфицирования. В первой группе из 649 человек оценивались безопасность, иммуногенность и эффективность вакцины MVA85A, оставшиеся включены в группу ретроспективного анализа. 324 волонтерам из первой группы в/к инъецировали вакцину MVA85A, 325 – плацебо. Второе бустерное введение вакцины MVA85A либо плацебо было проведено через 6–12 мес.

Иммуногенность вакцины оценивалась на 7-е и 28-е сутки после первой и второй иммунизаций, а возможное инфицирование *M. tuberculosis* регистрировалось в течение всего периода испытания. Помимо этого, у волонтеров определялось количество CD4-клеток при каждой процедуре.

Результаты испытания выявили, что по крайней мере один побочный эффект отмечен у 312 пациентов из группы плацебо и у 321 – в MVA85A группе. Они в основном представляли собой локальные поражения в месте введения. У некоторых наблюдались легкие гриппоподобные симптомы и региональная лимфаденопатия. Всего в обеих группах было зарегистрировано 17 серьезных побочных эффектов. Все они, за исключением одного, не были связаны с вакцинацией.

MVA85A вакцина индуцировала Ag85A-специфический Т-клеточный ответ с пиком на 7-е сутки после первой и бус-

терной иммунизаций. В основном он был представлен IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-17 цитокинами. Количество CD8⁺ Т-клеток было незначительным. Ag85A-специфический антительный ответ был очень невысоким.

К сожалению, эта вакцина не защищала против заражения *M. tuberculosis*, что было определено квантифероновым (QFT) методом. Количество волонтеров, которые из QFT-отрицательных на начало опыта стали QFT-положительными к концу испытания, составляло 20% иммунизированных MVA85A и 23% в группе, которой введено плацебо, независимо от получаемой антиретровирусной терапии.

Следовательно, выявляемый после применения вакцины MVA85A иммунный ответ был недостаточно эффективным, чтобы защитить от инфицирования *M. tuberculosis*.

Ранее было показано, что вакцина MVA85A безопасна и иммуногенна для лиц с латентной инфекцией *M. tuberculosis* [26]. Поскольку инфицирование ВИЧ повышает риск развития туберкулеза более чем в 10 раз, даже при относительно высоком содержании CD4⁺ Т-клеток, то возникла необходимость оценить эффективность этой вакцины на ВИЧ-инфицированных с латентной формой туберкулеза.

Испытание (фаза 2a) проводилось в Кейптауне в 2010–2011 гг. 48 добровольцев были разделены на 4 группы по 12 человек [27]. Группа 1 состояла из ВИЧ-неинфицированных волонтеров с латентной туберкулезной инфекцией. Группа 2 представлена ВИЧ-инфицированными, никогда не проходившими антиретровирусную терапию, волонтерами без латентной микобактериальной инфекции. Группа 3 – ВИЧ-инфицированные волонтеры, не проходившие курс антиретровирусной терапии с латентной микобактериальной инфекцией. Группа 4 – ВИЧ-инфицированные волонтеры, которые стабильно в течение более чем одного года получали антиретровирусную терапию, независимо от инфицирования *M. tuberculosis*. В группы 2 и 3 отбирались волонтеры с ВИЧ-инфекцией, диагностированной более чем за 3 мес до отбора. Возраст волонтеров от 18 до 50 лет (средний возраст по группам – 34–36 лет). Вакцина MVA85A вводилась в/к в дозе 5×10^7 БОЕ. В течение срока наблюдения (52 нед) было установлено, что серьезных побочных явлений не наблюдалось, за исключением легких побочных реакций в месте введения. Все местные реакции были легкой степени и проходили к 14-му дню. В 4-й группе они классифицировались скорее как средние. Общие реакции начинались на 2-е сутки и проходили к 28-му дню. Вакцина индуцировала сильный продолжительный иммунный ответ, представленный в основном полифункциональными CD4⁺ Т-клетками. Во всех 4 группах индуцировались IFN- γ , TNF- α , IL-2 цитокины. В группе 1, помимо них, отмечена еще индукция IL-17 цитокина. Общее количество CD4⁺ Т-клеток, индуцированных вакциной, было меньше у ВИЧ инфицированных волонтеров в группе 2. Антиретровирусная терапия не оказывала эффекта на иммуногенность вакцины. CD8⁺ Т-клетки не выявлены во всех 4 группах. Результаты этого испытания свидетельствовали, что MVA85A вакцина является безопасной и вызывает иммунный ответ у ВИЧ-инфицированных с латентной туберкулезной инфекцией.

Помимо испытания этой вакцины на взрослых волонтерах, она была исследована на подростках и детях. Вакцина

MVA85A оценивалась (фаза I/IIa) на 12 здоровых подростках в возрасте 13,3–15,0 лет (средний возраст 14,4 года) и 24 здоровых детях в возрасте 1,4–7,7 года (средний возраст 4,3 года) в Ворчестере (Южная Африка в 110 км от Кейптауна) в период с ноября 2006 г. по январь 2008 г. Все испытуемые были привиты вакциной BCG при рождении. Вакцина MVA85A вводилась п/к в дозе 5×10^7 БОЕ [28].

Все испытуемые хорошо перенесли иммунизацию. В группе подростков отмечались 64 побочные реакции, которые классифицированы как легкие и средние, тяжелых реакций не отмечено. Побочные реакции были сильно выражены в течение 2 дней после иммунизации, у 62% они проходили через 7 сут, у 30% – через 14, у оставшихся – через 28 сут после иммунизации.

В группе иммунизированных детей зафиксировано 112 побочных реакций, в основном представленных местными реакциями в месте введения вакцины. Реакции средней тяжести были связаны с подъемом температуры в первую неделю после вакцинации. 42% побочных явлений проходили к 7-м суткам, 49% – к 28-м суткам, 7% – к 84-м суткам и 1,8% – к 168-м суткам.

Вакцина MVA85A индуцировала сильный, длительный Т-клеточный иммунный ответ, представленный в основном полифункциональными CD4⁺ Т-клетками, экспрессирующими доминирующие IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-17 цитокины, которые наблюдались в обеих группах. У детей выявлена дополнительная экспрессия гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Вакцина индуцировала большее количество Т-клеток у подростков по сравнению с детьми. Ag85A специфические CD8⁺ Т-клетки не были определены после вакцинации в обеих группах. Следовательно, вакцина MVA85A безопасна для детей и подростков из эндемичного по туберкулезу района Южной Африки и индуцирует сильный длительный Т-клеточный ответ.

Безопасность и эффективность вакцины MVA85A в зависимости от применяемой дозы оценена на детях в возрасте от 5 до 12 мес в испытании (фаза 2), проведенном в Южной Африке вблизи Кейптауна в эндемичном по туберкулезу районе [29]. В испытании участвовали 144 здоровых, не инфицированных ВИЧ и *M. tuberculosis*, привитых BCG в 3-дневном возрасте детей, разделенных на 4 группы. Первая группа (средний возраст 270,5 дня) была в/к иммунизирована вакциной в дозе $2,5 \times 10^7$ БОЕ, вторая (средний возраст 278,5 дня) – 5×10^7 БОЕ, третья (средний возраст 188 дней) – 1×10^8 БОЕ, четвертая (средний возраст 252,5 дня) – плацебо.

Результаты испытания показали, что вакцина была безопасна при применении всех трех доз. Не отмечено выраженных побочных явлений, связанных с вакцинацией. Она индуцировала сильный, длительный, выявляемый на 168-е сутки (срок наблюдения) полифункциональный CD4⁺ Т-клеточный иммунный ответ, не зависящий от возраста испытуемых и дозы вакцины, представленный IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-17 цитокинами и GM-CSF. Она также индуцировала на низком уровне CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ, представленный образованием IFN- γ . Сделан вывод о том, что вакцина MVA85A индуцирует полифункциональный CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ у детей и может быть использована для их иммунизации.

Другие результаты получены в клиническом испытании этой вакцины (фаза IIb), проведенном в сельском районе вблизи Кейптауна в ЮАР, начиная с июня 2009 г. по май 2011 г. В испытании участвовали значительно большее (2797) количество детей в возрасте от 3 до 37 мес (средний возраст 24,6 мес). Все дети были предварительно вакцинированы BCG, у всех были отрицательные показатели на ВИЧ. Все дети рандомизированно разделены на 2 группы. Первой группе (1399 детей) была в/к введена MVA85A вакцина в дозе 1×10^8 БОЕ, второй (1398 детей) – плацебо. Дети, иммунизированные вакциной MVA85A, были разделены на группы, в которых изучались безопасность, иммуногенность и протективность от заражения туберкулезом [30].

Результаты испытания показали, что вакцина MVA85A безопасна и ее введение вызывало локальные побочные эффекты в количестве, не превышающем введение плацебо. Общие реакции были связаны с инфекцией нижнего отдела респираторного тракта или гастроэнтеритом.

Вакцина MVA85A индуцировала Ag85A-специфический Т-клеточный ответ. CD4⁺ Т-клетки преимущественно экспрессировали IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-17. Подобные цитокины не были определены в группе испытуемых, инъецированных плацебо. CD8⁺ Т-клетки не выявлены ни в одной группе. Однако случаи заболевания туберкулезом у детей (3% в группе плацебо и 2% в группе иммунизированных MVA85A вакциной) не позволяют однозначно оценить защитную эффективность этой вакцины. Кроме того, отмечено, что 13% иммунизированных детей и 12% в группе плацебо были инфицированы *M. tuberculosis*, что определялось QFT-тестом. Эффективность MVA85A вакцины в условиях данного клинического испытания получила оценку 3,8%.

Основным объяснением отсутствия защиты при проведении использованной схемы иммунизации авторы исследования считают недостаточное развитие иммунной системы у детей этого возраста, что приводит к меньшему защитному эффекту как при вакцинации вакциной BCG, так и при иммунизации вакциной MVA85A [31].

Результаты клинических испытаний вакцины MVA85A, экспрессирующей антиген 85A *Mycobacterium tuberculosis*, представлены в таблице 1.

Поскольку проведенные клинические испытания показали, что применение вакцины MVA85A, экспрессирующей только один иммунодоминантный антиген возбудителя туберкулеза, приводит к неоднозначным результатам, проводятся исследования по конструированию рекомбинантных штаммов на основе вируса вакцины MVA со встроенными генами нескольких иммунодоминантных антигенов. Так, был получен рекомбинант MVA/IL-15/5Mtb, содержащий гены 5 микобактериальных антигенов – ESAT6, Ag85A, Ag85B, HSP65, Mtb39A, и иммуностимуляторный цитокин IL-15 как молекулярный адъювант. При испытании этой мультивалентной вакцины на мышах было показано, что MVA/IL-15/5Mtb вакцина индуцирует значительно более высокие уровни IgG антител против антигенов *M. tuberculosis*, чем BCG-вакцина. Вакцина MVA/IL-15/5Mtb также защищала мышей при их последующем аэрогенном заражении возбудителем [32].

В дальнейших исследованиях для праймирования исследовали применение ESAT6 антигена – 85B белка *M. tuberculosis*. Для бустирования использовался рекомбинант MVA, экспрессирующий на высоком уровне 85A, 85B, ESAT6, HSP60, Mtb39 антигены *M. tuberculosis* с IL-15 в качестве молекулярного адъюванта. Было показано, что такая стратегия вакцинации индуцирует умеренный, но длительный иммунный ответ и иммунную память у мышей, по крайней мере, в течение всего срока наблюдения (18 мес).

Таким образом, результаты клинических испытаний свидетельствуют, что штамм MVA вируса вакцины может быть использован как вектор для создания вакцин против туберкулеза. Клинические испытания вакцины MVA85A, содержащей иммунодоминантный ген белка 85A возбудителя туберкулеза, использованной для бустерной иммунизации при проведении праймирования вакциной BCG, показали, что вакцина безопасна как для здоровых волонтеров, так и больных СПИДом и с латентной формой туберкулеза, а также подростков и детей. Ее применение при подкожном, внутримышечном и аэрогенном способах инфицирования в различных дозах не вызывало тяжелых побочных реакций.

Вакцина индуцировала образование CD4⁺ Т-клеточного иммунного ответа, а при больших дозах введения и CD8⁺ Т-иммунного ответа. Однако оценка защитной эффективности показала его недостаточность против заражения туберкулезом. Видимо, иммунный ответ, индуцированный только на один из 6 иммунодоминантных антигенов возбудителя туберкулеза, не обеспечивает эффективную защиту от этого заболевания. Поэтому проводятся исследования по созданию и оценке других рекомбинантных штаммов MVA, содержащих все иммунодоминантные антигены этого возбудителя.

Литература/References

1. Tuberculosis (Edinb). 2004;84(1-2):93-101.
2. Ndiaye BP, Thieneman F, Ota M, Landry BS, Camara M, Dieye S, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in healthy adults infected with HIV-1: a randomized, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med*. 2015 Mar;3(3):190-200. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00037-5
3. Griffiths KL, Pathan AA, Minassian AM, Sander CR, Beveridge NER, Hill AVS. Th1/Th17 Cell induction and corresponding reduction in ATP consumption following vaccination with the novel *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MVA85A. *PLoS One*. 2011;6(8):e23463. DOI: 10.1371/journal.pone.0023463.
4. Betts G, Poyntz H, Stylianou E, Reyes-Sandoval A, Cottingham M, Hill A, et al. Optimising Immunogenicity with Viral Vectors: Mixing MVA and HAdV-5 Expressing the *Mycobacterial* Antigen Ag85A in a Single Injection. *PLoS One*. 2012;7(12):e50447. doi: 10.1371/journal.pone.0050447
5. Glaziou P, Floyd K, Raviglione M. Global burden and epidemiology of tuberculosis. *Clin Chest Med*. 2009 Dec;30(4):621-36, vii. DOI: 10.1016/j.ccm.2009.08.017
6. Global tuberculosis control – epidemiology, strategy, financing. WHO/HTM/TB/. WHO, Geneva. Switzerland, 2009, 411.
7. Rabinovich NR, Mcnnes P, Klein DK, Hall BF. Vaccine Technologies: view to the future. *Science*. 1994;265(5177):1401-4.
8. Brennan MJ, Stoun MR, Evans T. A rational vaccine pipeline for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012 Dec;16(12):1566-73. DOI: 10.5588/ijtld.12.0569
9. Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Aug;79(16):4927-31
10. Machett M, Smith GL, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Dec;79(23):7415-9.
11. Pfeleiderer M, Falkner FG, Dorner F. A novel vaccinia virus expression system allowing of recombinants without the need for selection markers, plasmids and bacterial hosts. *J Gen Virol*. 1995 Dec;76 (Pt 12):2957-62. DOI: 10.1099/0022-1317-76-12-2957
12. Smith JZ, Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25000 base pairs of foreign DNA. *Gene*. 1983 Nov;25(1):21-8.
13. Boursnell ME, Foulds IJ, Campbell JI, Binns MM. Non-essential genes in the vaccinia virus Hindm K. fragment; a gene related to serine protease inhibitors and a gene related to the 37K vaccinia virus major envelope antigen. *J Gen Virol*. 1988 Dec;69 (Pt 12):2995-3003.
14. Guliane JC, Saiag P, Wechsler J, Lescs MC, Roujeau JC. Vaccinia from recombinant virus expressing HIV genes. *Lancet*. 1991 Apr 27;337(8748):1034-5.
15. Antoine J, Scheifflinger F, Dorner F, Falkner FJ. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*. 1998 May 10;244(2):365-96. DOI: 10.1006/viro.1998.9123
16. Baur K1, Brinkmann K, Schweneker M, Pätzold J, Meisinger-Henschel C, Hermann J, et al. Immediate-early expression of a recombinant antigen by modified vaccinia virus Ankara breaks the immunodominance of strong vector-specific B8R antigen in acute and memory CD8 T-cell responses. *J J Virol*. 2010 Sep;84(17):8743-52. DOI: 10.1128/JVI.00604-10
17. Kolibab K, Yang A, Derrick SC, Waldmann TA, Perera LP, Morris SL. Highly persistent and effective prime/boost regimens against tuberculosis that use a multivalent modified vaccine virus Ankara-based Tuberculosis vaccine with interleukin-15 as a molecular adjuvant. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 May;17(5):793-801. DOI: 10.1128/CVI.00006-10.
18. Beveridge NE, Price DA, Casuzza JP, Pathan AA, Sander TE, Asher TE, et al. Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4⁺ memory T lymphocyte populations. *Eur J Immunol*. 2007 Nov;37(11):3089-100. DOI: 10.1002/eji.200737504
19. Goonetilleke NP, McShane H, Hannan CM. Enhanced immunogenicity and protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* of bacilli Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J Immunol*. 2003 Aug 1;171(3):1602-9.
20. McShane H, Pathan AA, Sander CR, Kearing SM, Gilbert SC. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med*. 2004 Nov;10(11):1240-4. DOI: 10.1038/nm1128
21. Hopkins R, Bridgeman A, Joseph J, Gilbert SC, McShane H, Hanke T. Dual neonate vaccine platform against HIV-1 and *M. tuberculosis*. *PLoS One*. 2011;6(5):e20067. DOI: 10.1371/journal.pone.0020067
22. Hawkrigge T, Scriba JT, Gelderbloem S, Smit E, Tameris M, Moyo S, et al. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J Infect Dis*. 2008 Aug 15;198(4):544-52. DOI: 10.1086/590185.
23. Meyer J, Harris SA, Satti I, Poulton ID, Poyntz HC, Tanner R, et al. Comparing the safety and immunogenicity of a candidate TB vaccine MVA85A administered by intramuscular and intradermal delivery. *Vaccine*. 2013 Feb 4;31(7):1026-33. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.12.042.
24. Gherardi MM, Esteban M. Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J Gen Virol*. 2005 Nov;86(Pt 11):2925-36. DOI: 10.1099/vir.0.81181-0
25. Satti J, Meyer SA, Harris Z-R, Thomas M, Griffiths K, Antrobus RD, et al. Safety and immunogenicity of a candidate tuberculosis vaccine MVA85A delivered by aerosol in BCG-vaccinated healthy adults: a phase 1, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2014 Oct;14(10):939-46. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70845-X

26. Sander CR, Pathan AA, Beveridge NE, Poulton I, Minassian A, Alder N, et al. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A. in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Apr 15;179(8):724-33. DOI: 10.1164/rccm.200809-1486OC
27. Scriba JT, Tameris M, Smit E, van der Merwe L, Hughes EJ, Kadiga B, et al. A phase II trial of the new Tuberculosis vaccine, MVA85A, in HIV- and/or *Mycobacterium tuberculosis*-infected adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Apr 1;185(7):769-78. DOI: 10.1164/rccm.201108-1548OC.
28. Scriba JT, Tameris M, Mansoor N, Smit E, van der Merwe L, Isaacs F, et al. MVA85A, a novel TB vaccine, is safe in adolescents and children, and induces complex subset of polyfunctional CD4+ T cell. *Eur J Immunol*. 2010 Jan;40(1): 279-90. DOI: 10.1002/eji.200939754
29. Scriba JT, Tameris M, Mansoor N, Smit E, van der Merwe L, Mauff K, et al. Dose-finding study of the novel tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy BCG-vaccinated infants. *J Infect Dis*. 2011 Jun 15;203(12):1832-43. DOI: 10.1093/infdis/jir195
30. Tameris MD, Hathehli M, Landry BS, Scriba JT, Snowden MA, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2013 Mar 23;381(9871):1021-8.
31. Matsumiya M, Stylianou E, Griffiths K, Lang Z, Meyer J, Harris SA, et al. Roles for *treg* expansion and HMGB1 signaling through the TLR1-2-6 axis in determining the magnitude of the antigen-specific immune response to MVA85A. *PLoS One*. 2013 Jul 3;8(7):e67922. DOI: 10.1371/journal.pone.0067922.
32. Perera Pin-Yu, Derrick SC, Kolibab K, Momoi F, Yamamoto M, Morris SL, et al. A Multi-valent vaccinia virus-based Tuberculosis vaccine molecularly adjuvanted with interleukin-15 induces robust immune responses in mice. *Vaccine*. 2009 Mar 26;27(15):2121-7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.132

Информация о соавторах:

Павельев Дмитрий Игоревич, научный сотрудник ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации
Адрес: 141306, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

Стовба Людмила Федоровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации
Адрес: 141306, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

Писцов Михаил Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации
Адрес: 141306, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

Лебедев Виталий Николаевич, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации
Адрес: 141306, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

Information about co-authors:

Dmitry I. Pavlev, researcher of research department of 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of the Defense of the Russian Federation
Address: 11 Oktyabrskaya str., Moscow region, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

Ludmila F. Stovba, PhD (Biology), senior researcher of research department of 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of the Defense of the Russian Federation
Address: 11 Oktyabrskaya str., Moscow region, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

Mikhail N. Pistcov, PhD (Biology), senior researcher of research department of 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of the Defense of the Russian Federation
Address: 11 Oktyabrskaya str., Moscow region, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

Vitaly N. Lebedev, Doctor of Science (Biology), professor, researcher of research department of 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of the Defense of the Russian Federation
Address: 11 Oktyabrskaya str., Moscow region, Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

НОВОСТИ НАУКИ

Вспышка кишечной инфекции в Норвегии

Органы здравоохранения сообщают о вспышке O157: H7 *E. coli*. С начала июня заболели 6 человек. Норвежский институт общественного здравоохранения совместно с муниципальной службой здравоохранения и Норвежским управлением безопасности пищевых продуктов и Ветеринарным институтом выясняют, был ли у пациентов общий источник инфекции. Проводятся интервью с пациентами и отбираются пробы для анализа из домов.

Norway reports E. coli outbreak: Investigation ongoing – Outbreak News Today [WWW Document], n.d.
URL <http://outbreaknewstoday.com/norway-reports-e-coli-outbreak-investigation-ongoing-79208/>.

Антибиотикоустойчивая *Klebsiella pneumoniae* зарегистрирована у путешественников на Канарские острова

Сообщается, что группа европейских туристов, возвращающихся с острова Гран-Канария, перенесли или были инфицированы карбапенемазой (OXA-48), производящей *Klebsiella pneumoniae* ST392. По данным ECDC Rapid Risk Assessment, группа европейских туристов, вернувшихся с острова Гран-Канария, были заражены *Klebsiella pneumoniae* ST392 с карбапенемазой (OXA-48).

Europe: Drug resistant Klebsiella pneumoniae reported in travelers to the Canary Islands – Outbreak News Today [WWW Document], n.d. URL <http://outbreaknewstoday.com/europe-drug-resistant-klebsiella-pneumoniae-reported-travelers-canary-islands-14349/>.

Актуальные аспекты преподавания микробиологии в медицинском вузе и подготовки врачей-микробиологов на современном этапе

Г.Ш.Исаева^{1,2}, С.Н.Габидуллина^{1,2}

¹ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Казань, Российская Федерация

Раскрыты особенности обучения на кафедре микробиологии в медицинском вузе, рассмотрены основные проблемы, возникающие в процессе подготовки врача-медицинского микробиолога. Сформулированы основные направления и задачи, стоящие перед кафедрами микробиологии и требующие решения в условиях инновационного развития. Подчеркнута необходимость создания типовой программы по микробиологии, единой для всех медицинских вузов, разработки стандарта, определяющего структуру, планировку помещений кафедр микробиологического профиля, оснащение и утверждение перечня музейных культур, разрешенных для использования в учебных целях, итоговой аккредитации по специальности «Медицинская микробиология» для выпускников медико-биологического факультета по специальности «Медицинская биохимия» с последующей профессиональной переподготовкой по специальности «Медицинская микробиология».

Ключевые слова: кафедра микробиологии, подготовка врача-медицинского микробиолога, оптимизация обучения

Для цитирования: Исаева Г.Ш., Габидуллина С.Н. Актуальные аспекты преподавания микробиологии в медицинском вузе и подготовки врачей-микробиологов на современном этапе. Бактериология. 2018; 3(2): 51–56. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-51-56

Actual aspects of teaching microbiology in the medical university and training of doctors-microbiologists at the present stage

G.Sh.Isaeva^{1,2}, S.N.Gabidullina^{1,2}

¹Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Rosпотребнадзор, Kazan, Russian Federation;

²Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

The features of teaching at the department of microbiology in a medical university are revealed. The main problems arising in the process of medical doctor-microbiologist training are considered. The main directions and tasks facing the departments of microbiology and requiring solutions in the conditions of innovative development are formulated. The need to create a standard program on microbiology, uniform for all medical schools, to develop a standard defining the structure, layout of microbiological profile rooms, equipping and approving the list of museum cultures allowed for use in training purposes, the final accreditation for the specialty «Medical Microbiology» for graduates Medical and Biological Faculty, specializing in «Medical Biochemistry» followed by professional retraining in the specialty «Medical microbiology».

Keywords: department of Microbiology, training of a medical microbiologist, optimization of training

For citation: Isaeva G.Sh., Gabidullina S.N. Actual aspects of teaching microbiology in the medical university and training of doctors-microbiologists at the present stage. Bacteriology. 2018; 3(2): 51–56. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-51-56

Для корреспонденции:

Исаева Гузель Шавхатовна, доктор медицинских наук, директор ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, заведующая кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» МЗ РФ

Адрес: 420015, Казань, ул. Большая Красная, 67

Телефон: (843)236-6721

E-mail: guzelleisaeva@yandex.ru

Статья поступила 27.07.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

Guzel Sh. Isaeva, MD, PhD, DSc, director, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, head of microbiology department of Kazan State Medical University

Address: 67 Bol'shaya Krasnaya str., Kazan, 420015, Russian Federation

Phone: (843) 236-6721

E-mail: guzelleisaeva@yandex.ru

The article was received 27.07.2018, accepted for publication 27.06.2018

Медицинская микробиология – это раздел микробиологии, изучающий микроорганизмы, имеющие значение в патологии человека. Медицинская микробиология изучает биологические свойства возбудителей (морфологию, физиологию, генетику, экологию, факторы патогенности) и патогенез вызываемых заболеваний. В практическом плане в задачи этой дисциплины входит разработка методов специфической диагностики, подходов к этиотропному лечению и профилактике инфекционных заболеваний. Кроме того, в настоящее время сформировались отдельные направления микробиологии, такие как санитарная, экологическая, клиническая микробиология.

Санитарная микробиология – особая отрасль микробиологической науки, возникшая на стыке медицинской микробиологии, эпидемиологии и гигиены. В задачи санитарной микробиологии входит разработка: методов микробиологических исследований; нормативной документации, определяющей соответствие микрофлоры объектов окружающей среды гигиеническим требованиям и обеспечивающей санитарно-эпидемиологическое благополучие; мероприятий по оздоровлению объектов внешней среды путем воздействия на микрофлору и оценка эффективности их проведения. Микробиологические исследования активно используются в надзорных мероприятиях при проведении эпидемиологических и санитарно-гигиенических исследований и наблюдений.

Экологическая микробиология направлена на выявление и изучение особенностей и закономерностей жизнедеятельности микрофлоры окружающей среды во взаимоотношениях ее с человеком, а также исследование микробиоты и микробиома человека с целью поиска неизвестных ранее звеньев патогенеза и, соответственно, адекватных подходов к лечению и профилактике заболеваний, связанных с дисбиотическими нарушениями, таких как сахарный диабет, ожирение, аллергия, синдром раздраженного кишечника и т.д., что обуславливает возрастание научного интереса к этой отрасли микробиологии.

Достижения медицинской микробиологии позволили пересмотреть взгляды на некоторые микроорганизмы, считавшиеся ранее условно-патогенными, а по современным представлениям являющиеся этиологическими факторами многих заболеваний, что способствовало становлению и развитию отдельной отрасли микробиологической науки – клинической микробиологии. В задачи клинической микробиологии входит изучение роли условно-патогенных микроорганизмов в патогенезе инфекционных и соматических заболеваний; разработка методов лабораторной диагностики, этиотропной терапии и специфической профилактики инфекционных заболеваний в неинфекционных лечебных учреждениях; микробиологический мониторинг за возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, изучение резистентности патогенных и условно-патогенных бактерий, выделенных от пациентов, медицинского персонала и из различных объектов госпитальной среды, к антисептикам и дезинфектантам с целью оптимизации эпидемиологического надзора, совершенствования профилактических и противоэпидемических мероприятий в медицинских учреждениях.

В современных условиях реформирования систем образования и здравоохранения возрастает значение фундамен-

тальных дисциплин при подготовке специалистов с высшим медицинским образованием. Микробиология в контексте медицинской науки давно вышла за рамки чисто теоретического предмета и приобрела статус прикладной клинической дисциплины, абсолютно необходимой врачу любой специальности [1]. Кроме того, микробиология, разрабатывающая на основе достижений фундаментальных наук систему представлений и конкретных знаний и умений, является научной основой лабораторного обеспечения в микробиологических исследованиях.

Микробиология на сегодняшний день – это развитая отрасль знаний, тесно связанная с другими дисциплинами, прежде всего клиническими (инфекционные болезни, внутренние болезни, акушерство и гинекология, ЛОР-болезни, хирургические болезни и т.д.), медико-профилактическими (эпидемиология, гигиена), а также фундаментальными (биология, генетика, биохимия и др.) [2]. Среди всех видов лабораторных исследований биоматериала человека *in vitro* – гематологических, общеклинических, биохимических, иммунологических, серологических, цитологических, генетических, токсикологических – микробиологические исследования занимают особое положение. Это обусловлено возрастанием инфекционных рисков общественному здоровью и биологической безопасности, связанных, в частности, с угрозами распространения эпидемий известных инфекций, появлением новых и «возвращающихся» инфекций, угрожающим распространением микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью к антимикробным препаратам, опасностью биотерроризма, развитием новых технологий синтетической микробиологии, позволяющей создавать новых возбудителей или реанимировать «старых» с приданием им новых вирулентных свойств, в связи с чем возникает необходимость разработки новых методологических подходов при подготовке врачей-микробиологов.

В плане преподавания микробиология является таким предметом, в котором сочетаются и тесно переплетаются консерватизм и инновации [3, 4]. По-прежнему «золотым стандартом» микробиологии остается микробиологический (бактериологический, микологический, вирусологический) метод исследования, направленный на выделение чистой культуры возбудителя и его идентификацию. Алгоритм культурального метода со времен Роберта Коха и Луи Пастера практически не претерпел существенных изменений, и как пророчески сегодня звучат слова К.А.Тимирязева: «Грядущие поколения, конечно, дополнят дело Пастера, но, как бы далеко они не зашли вперед, они всегда будут идти по проложенному им пути».

Но для качественной подготовки современного врача требуется внедрение и инновационных образовательных технологий. В этой связи большое значение приобретает разработка и внедрение федеральных государственных образовательных стандартов (ФГОС) высшего профессионального образования, где должна учитываться преемственность между классическими и инновационными методами обучения, связь между фундаментальными и клиническими дисциплинами. Научно-педагогические коллективы кафедр микробиологии ищут пути интенсификации обучения медицинской микробиологии, предлагают различные организационно-методические основы обучения в рамках реализа-

ции требований ФГОС [5, 6]. Однако, анализируя рабочие программы по микробиологии, вирусологии и иммунологии для различных факультетов, приходится констатировать наличие значительных вариаций по количеству учебных часов, содержанию программ и их обеспечению в разных медицинских вузах Российской Федерации. Так, обучение по дисциплине «Микробиология, вирусология, иммунология» студентов медико-профилактического факультета в одних вузах продолжается три семестра, в других – только два. В некоторых вузах изучение иммунологии вынесено в отдельную дисциплину, в других – включено в дисциплину «Микробиология, иммунология», также в некоторых учебных программах отсутствуют отдельные вопросы по санитарной, клинической микробиологии, паразитологии, микологии. Возможно, эти отличия обусловлены традициями, сложившимися на различных кафедрах микробиологии медицинских вузов, их материально-техническим оснащением, различиями в количестве учебных часов. Вместе с тем необходимы в качестве основы разработка и внедрение типовых учебных программ по каждой дисциплине и для каждого факультета, состоящих из базовой части и вариативной (не более 20%), которая бы могла варьировать в зависимости от региональных особенностей вуза. Внедрение таких типовых программ на фиксированный срок (не менее 5 лет) могло бы значительно облегчить труд преподавателей, вынужденных большую часть своего времени посвящать переработке рабочих программ и, соответственно, всего комплекса учебно-методического обеспечения и фондов оценочных средств, а самое главное – способствовало бы унификации и стандартизации образовательного процесса.

Современный образовательный процесс предполагает возможность свободного пользования различными информационными ресурсами как студентами, так и преподавателями в любое удобное для них время. Функционирование информационно-образовательной среды обеспечивается средствами информационно-коммуникационных технологий, электронного обучения, дистанционных образовательных технологий (ДОТ), без которых уже невозможно представить процесс обучения современного студента. Внедрение ДОТ в медицинском вузе позволяет решать задачи интенсификации самостоятельной работы обучающихся, повышения общеобразовательного и культурного уровня студентов, повышения их мобильности, активизации системы контроля качества образования. Самостоятельная работа студентов в настоящее время подразумевает не только ознакомление с материалами учебника и лекций, но также изучение дополнительных учебно-методических материалов в электронной форме, в том числе и представленных на образовательных порталах кафедр медицинских вузов, работу с интерактивными учебниками, атласами, с сетевыми или автономными мультимедийными электронными практикумами, работу с базами данных удаленного доступа, подготовку тематических рефератов, эссе, презентаций, а также, что немаловажно, дает возможность повторить уже изученный на аудиторных занятиях материал и пройти дистанционное тестирование для оценки полученных знаний. С помощью интернет-технологий (например, система Moodle) можно осуществлять текущий, промежуточный и итоговый контроль полученных студентами знаний в виде

тестовых заданий, при этом результаты такого тестирования позволяют самим обучающимся оценивать уровень полученных по дисциплине знаний, акцентировать внимание на недостаточно освоенных темах.

Но, несмотря на широкое внедрение телекоммуникационных технологий, базой обучения все-таки остается непосредственное, очное вербальное общение преподавателя и обучающихся. Никакие дистанционные технологии не смогут обеспечить студентам получение практических навыков по микробиологии: умение правильно произвести забор материала для исследования, посев на питательные среды, приготовить мазки и провести микроскопию материала, поставить серологическую реакцию, антибиотикограмму и т.д. Поэтому особое значение приобретает материально-техническое оснащение кафедр микробиологии.

Любая работа с микроорганизмами, в том числе и в учебных целях, регламентируется требованиями действующих санитарно-эпидемиологических правил (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций»), что ставит перед микробиологическими кафедрами ряд трудно разрешимых вопросов по организации учебного процесса и выполнению требований биологической безопасности к зонированию помещений. Провести реконструкцию существующих помещений многих кафедр микробиологии с разделением на «чистую» и «заразную» зоны с санпропускником в соответствии с санитарными требованиями не всегда выполнимо из-за планировочных и технологических ограничений. Эти проблемы можно решать путем размещения кафедр микробиологии в двух зонах. Так, в «условно чистой» зоне – размещать кабинеты преподавателей, компьютерные классы, помещения для приготовления питательных сред, стерилизации. В «условно заразной» – вспомогательные помещения (автоклавы для дезинфекции, лаборантские, помещения для микроскопии и т.д.) и учебные комнаты, оснащенные бактерицидными облучателями, раковиной, необходимыми средствами для дезинфекции столов и обработки рук и с условным разделением на «заразную» и «чистую» зоны, где могут быть выделены столы для работы с учебно-методическими материалами и отдельные лабораторные столы для выполнения практических занятий. Однако эти планировочные решения в случае их принятия необходимо закрепить в нормативной документации и придать им официальный статус.

Еще одним ключевым моментом по обеспечению выполнения требований биологической безопасности работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности является обеспечение кафедр микробиологии музейными культурами. Несмотря на широкое внедрение в образовательный процесс компьютерных технологий, использование для обучения виртуальных средств обучения, симуляционного оборудования, муляжей, имитантов, готовых препаратов и пр., работу студентов с живыми культурами микроорганизмов для отработки практических навыков ничем нельзя заменить. Вопрос обеспечения кафедр музейными штаммами может быть решен путем разрешения использования для работы студентов пробиотических и сапрофитических культур (например, *E. coli*, выделенной из препарата «Колибак-терин», спорообразующих бактерий – из «Субтилин», мо-

лочнокислых стрептококков и т.п.), вместе с тем такой ограниченный спектр культур не позволит проводить на должном уровне все практические занятия. Назрела необходимость утверждения перечня музейных культур, разрешенных для использования в учебных целях. Так, попытку создания такого перечня можно обнаружить в паспорте экзаменационной станции «Микробиологические исследования» при первичной аккредитации специалистов по специальности «Медицинская биохимия» [7], где в качестве кокковой культуры предлагается использование *S. epidermidis*, грамотрицательных палочек – *E. coli*, спорообразующих палочек – *B. pseudanthracis*, ветвящихся бактерий – актиномицетов. В связи с вышесказанным остро встает вопрос о допуске студентов к работе с биологическим материалом. Получение лицензии на работу с микроорганизмами III–IV групп патогенности в соответствии с существующими СП для большинства кафедр микробиологии является затруднительным из-за большого потока обучающихся (в неделю через кафедру могут проходить сотни и даже тысячи студентов), несоответствия существующего набора помещений объемно-планировочным требованиям и т.д., что ставит вопрос о необходимости разработки нормативного документа, регламентирующего организацию учебного процесса на кафедрах микробиологического профиля, включая требования к помещениям, оборудованию, музейным культурам и проведению работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) с образовательной целью.

На многих кафедрах микробиологии медицинских вузов существуют проблемы с материально-техническим оснащением современным диагностическим оборудованием, тест-системами и т.п. Для качественной подготовки врача, способного конкурировать на международном рынке труда, требуются новейшие научные разработки, применяемые в практике лабораторных исследований (автоматизированные микробиологические анализаторы, оборудование для проведения молекулярно-генетических, масс-спектрометрических, иммунологических исследований, диагностические тест-системы, наборы для иммунохроматографии и т.д.). Оснащение кафедр микробиологии новейшим оборудованием позволит не только повысить уровень образования, но и поднять университетскую науку на качественно новую ступень развития, проводить научно-исследовательские работы силами студентов под руководством ведущих преподавателей, что откроет новые перспективы для микробиологической науки и практики. Возможны и другие варианты решения данного вопроса, например в форме организации кафедр микробиологии на клинических базах уже действующих лабораторий, где можно выделить отдельные учебные комнаты для работы студентов. Но этот путь возможен только при дополнительных капитальных вложениях и строительстве новых лабораторных комплексов.

Одним из обязательных требований ФГОС к условиям реализации специалитета для формирования у обучающихся в медицинском вузе общепрофессиональных и профессиональных компетенций являются требования к материально-техническому оснащению. Учебные комнаты должны быть оснащены техническими средствами обучения и необходимым оборудованием с возможной заменой его на виртуальные аналоги. Однако виртуальные аналоги микробиоло-

гического оборудования еще не созданы, и хотя, возможно, это и исполнимо в будущем, но реалии сегодняшнего дня настоятельно диктуют необходимость модернизации кафедр микробиологического профиля уже в настоящем. Несомненно, материально-техническое переоснащение кафедр микробиологии требует значительных финансовых средств, что может быть трудновыполнимым для медицинского вуза самостоятельно, без серьезной государственной поддержки, и указывает на необходимость разработки федеральной программы по развитию вузовской науки. Но без этих мероприятий невозможно удовлетворить потребности общества в квалифицированных медицинских специалистах, а также в научно-педагогических кадрах, в том числе и врачах-исследователях.

Высокие риски общественному здоровью и безопасности, связанные с биологическими факторами, ставят перед специалистами микробиологической службы задачи по готовности к быстрой индикации и идентификации ПБА с использованием новейших эффективных методов диагностики. Современная микробиологическая лаборатория – это сложный инженерный комплекс, оборудованный высокотехнологическим оборудованием, автоматизированными системами для проведения микробиологических, иммунологических, молекулярно-генетических исследований, именно поэтому сегодня возрастает роль микробиологов, владеющих специальными знаниями по всем разделам микробиологии (бактериологии, вирусологии, микологии, паразитологии). Современная действительность диктует необходимость перемен в профессиональной подготовке и переподготовке кадров для микробиологической службы. Хороший и грамотный микробиолог – это всегда штучный и редкий «товар» на рынке труда, поэтому все изменения должны быть продуманными и экономически обоснованными, дабы не усугубить ситуацию по обеспечению высококвалифицированными кадрами микробиологических лабораторий различной ведомственной принадлежности.

На обсуждение специалистам вынесен проект профессионального стандарта «Специалист в области медицинской микробиологии» [8]. Как указано в пояснительной записке [9], указанный стандарт разработан для новой специальности «Медицинская микробиология», которая объединяет существующие специальности «Вирусология», «Бактериология», «Лабораторная микология», «Паразитология» в одну крупную специальность и вводит новую должность – врач-медицинский микробиолог. Принятие нового профессионального стандарта влечет за собой необходимость кардинальных преобразований в сфере подготовки таких специалистов. Основная нагрузка ляжет на кафедры микробиологии, проводящие постдипломное обучение в форме профессиональной переподготовки по специальности «Медицинская микробиология» либо осуществляющие подготовку в ординатуре. Эти преобразования потребуют полного переоснащения кафедр, привлечения клинических баз (заключения договоров с практическими лабораториями), пересмотра всех учебных программ, а также переобучения преподавательского состава, способного обеспечить подготовку специалистов всех четырех направлений. Таким образом, законодательно закрепится переход микробиологии из чисто теоретического предмета в статус фундаментальной и при-

кладной клинической дисциплины. На врача-медицинского микробиолога, согласно новому профессиональному стандарту, возлагаются широкие трудовые функции: организационно-методическое обеспечение микробиологических исследований (клинических, санитарных, бактериологических, вирусологических, микологических, паразитологических) и их выполнение с использованием всего арсенала современных диагностических методов, включая иммуносерологические, молекулярно-генетические и масс-спектрометрические; оказание консультативной помощи медицинским работникам в вопросах планирования микробиологических исследований с целью диагностики или обследования объектов окружающей среды и интерпретации результатов. Именно последняя трудовая функция отличает врача-медицинского микробиолога от биолога, который способен непосредственно выполнять микробиологические исследования, но их планирование и интерпретация результатов являются уже врачебной функцией, и это должно уменьшить тенденцию замены врачебных кадров в медицинских лабораториях специалистами с биологическим образованием.

Несмотря на позитивные изменения, которые должны произойти после принятия нового профессионального стандарта, остается ряд вопросов по подготовке врачей-микробиологов. И в первую очередь это касается сложности и продолжительности времени обучения выпускников медицинских вузов. Чтобы стать врачом-микробиологом, выпускнику нужно будет два года проучиться в ординатуре по специальности «Медицинская микробиология» (которой пока нет) или «Эпидемиология», «Клиническая лабораторная диагностика», «Инфекционные болезни». Но как показывает опыт, ординаторы, окончившие ординатуру по трем последним специальностям, не спешат становиться врачами-микробиологами, а становятся соответственно врачами-инфекционистами, эпидемиологами или врачами КДЛ. Обучаясь в ординатуре в течение 2 лет, выпускник лишен возможности совмещать учебу с работой в микробиологической лаборатории, поскольку у него нет разрешения на допуск к ПБА до окончания ординатуры, что ставит будущего специалиста в тяжелое финансовое положение, даже если обучение проходит на бюджетной основе. В настоящее время в микробиологической лаборатории не предусмотрено на должность врач-стажер, и заведующие лабораториями, чтобы не потерять молодого специалиста, подчас вынуждены его оформлять на должности, не связанные с работой с ПБА (например, документоведом и т.п.), что снижает привлекательность работы и приводит к утечке кадров. Уже сейчас микробиологические лаборатории испытывают кадровый дефицит в молодых врачах, происходит замена врачебного состава на специалистов с биологическим образованием, и отсутствие решения кадрового обеспечения может привести уже в ближайшее время к коллапсу в этой отрасли медицины. На наш взгляд, решением данной проблемы может стать либо введение должности врач-стажер или врач-ординатор, либо разрешение на прием на работу в микробиологические лаборатории ординаторов с допуском к ПБА с правом проведения микробиологических исследований под контролем наставников без права интерпретации результатов. Также одним из решений может стать введение итоговой аккредитации по специальности «Меди-

цинская микробиология» для выпускников медико-биологического факультета по специальности «Медицинская биохимия» с последующей профессиональной переподготовкой по специальности «Медицинская микробиология», у которых в соответствии с приказом от 8 октября 2015 года №707н «Об утверждении квалификационных требований к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим и образованием по направлению подготовки "Здравоохранение и медицинские науки"» утверждены квалификационные требования по специальности «Бактериология» и «Вирусология» без необходимости прохождения ординатуры.

Резюмируя вышесказанное, считаем, что перед медицинским микробиологическим сообществом стоят задачи, на решение которых необходимо направить весь имеющийся научно-педагогический потенциал кафедр микробиологии при их широком обсуждении и взаимодействии с практическим здравоохранением и микробиологической службой, а именно:

1. Создание типовой программы по микробиологии, единой для всех медицинских вузов.
2. Разработка и принятие стандарта, определяющего структуру, планировку помещений кафедр микробиологического профиля, оснащение и утверждение перечня музейных культур, разрешенных для использования в учебных целях.
3. Дальнейшее развитие и внедрение инновационных образовательных технологий в процесс преподавания микробиологии.
4. Модернизация материально-технического оснащения кафедр микробиологии современным оборудованием с целью подготовки квалифицированных медицинских специалистов и научно-педагогических кадров.
5. Совершенствование системы подготовки и переподготовки кадров, принятие нового профессионального стандарта с учетом замечаний и предложений, полученных в ходе его широкого обсуждения, введение должности врач-стажер (ординатор)-медицинский микробиолог, итоговой аккредитации по специальности «Медицинская микробиология» для выпускников медико-биологического факультета по специальности «Медицинская биохимия» с последующей профессиональной переподготовкой по специальности «Медицинская микробиология».

Литература

1. Плахтий ЛЯ. О специфике преподавания микробиологии, вирусологии и иммунологии на стоматологическом факультете СОГМА. Фундаментальные исследования. 2006;7:87-8.
2. Наумов ГН, Городин ВН. Формирование единого учебного пространства в преподавании инфекционных болезней, эпидемиологии и микробиологии. Международный журнал экспериментального образования. 2014;10:219-222.
3. Мисетов ИА, Алёхина ГП. Особенности преподавания курса «Микробиология» в блоке дисциплин «Микробиология, вирусология и иммунология» при подготовке биологов в оренбургском государственном университете. Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры. Сборник статей по материалам Всероссийской научно-методической конференции. 2017; с. 1934-1937.
4. Нараева НЮ, Земсков АМ, Старцева СВ, и др. Особенности педагогического процесса на кафедре микробиологии. Инновации в науке: сборник статей по материалам XXXIX международной научно-практической конференции. 2014;11(36):124-8.

- Бабичев СА, Качанова ОА, Малышева ТВ, Сиюхова ФШ, Кроличенко ТП, Вяткина ГГ, Наумов ГН. Пути интенсификации обучения медицинской микробиологии. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2017;4(1):25-7.
- Леонов ВВ, Ананьина ИВ, Деревянко ЛН, и др. Организационно-методические основы проблемно-модульного обучения микробиологии, вирусологии в медицинском вузе. Медицина и образование в Сибири. 2015;1:2.
- Бажукова ТА, Хромова АВ, Жданова ОС, и др. Паспорт экзаменационный (типовой) «Микробиологические исследования». Методический центр аккредитации специалистов. 2017, с. 21.
- Проект профессионального стандарта «Специалист в области медицинской микробиологии» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/prof.standard-20170519.pdf>
- Пояснительная записка к проекту профессионального стандарта «Специалист в области медицинской микробиологии» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberpedia.su/8xaa99.html>
- Naraeva NYu, Zemskov AM, Startseva SV, et al. Osobennosti pedagogicheskogo protsessa na kafedre mikrobiologii. Innovatsii v nauke. 2014;11(36):124-8. (In Russian).
- Babichev SA, Kachanova OA, Malysheva TV, Siyukhova FSh, Krolichenko TP, Vyatkinna GG, Naumov GN. Puti intensifikatsii obucheniya meditsinskoj mikrobiologii. International Journal of Applied and Fundamental Research. 2017;4(1):25-7. (In Russian).
- Leonov VV, Ananina IV, Derevyanko LN, Sokolova TN, Shelestyuk VV. Organizational and methodical bases of problem and modular training on microbiology, virology in medical school. Medicine and Education in Siberia. 2015;1:2. (In Russian).
- Bazhukova TA, Khromova AV, Zhdanova OS, et al. Passport examination (typical) "Microbiological research". Methodical centre of accreditation experts. 2017, p. 21. (In Russian).
- Draft professional standard "Specialist in Medical Microbiology". Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/prof.standard-20170519.pdf> (In Russian).
- Note to the draft professional standard "Specialist in Medical Microbiology". Available at: <https://cyberpedia.su/8xaa99.html> (In Russian).

References

- Plattii LA. About specificity of teaching of microbiology, virology and immunology at stomatologic faculty SOGMA. Fundamental Research. 2006;7:87-88. (In Russian).
- Naumov GN, Gorodin VN. Formirovanie edinogo uchebnogo prostranstva v prepodavanii infektsionnykh boleznei, epidemiologii i mikrobiologii. Mezhdunarodnyi zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya. 2014;10:219-222. (In Russian).
- Misetov IA, Alekhina GP. Osobennosti prepodavaniya kursa «Mikrobiologiya» v bloke distsiplin «Mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya» pri podgotovke biologov v orenburgskom gosudarstvennom universitete. Proceedings of the all-Russian scientific and methodical conference. 2017; pp. 1934-1937. (In Russian).

Информация о соавторе:

Габидуллина Светлана Назаровна, кандидат медицинских наук, начальник отдела кадров ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, доцент кафедры общей гигиены с курсом радиационной гигиены ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» МЗ РФ
Адрес: 420015, Казань, ул. Большая Красная, 67
Телефон: (843) 236-6252
E-mail: mar228@mail.ru

Information about co-author:

Svetlana N. Gabidullina, MD, PhD, personnel manager, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, associate Professor of General hygiene with the course of radiation hygiene, Kazan State Medical University
Address: 67 Bol'shaya Krasnaya str., Kazan, 420015, Russian Federation
Phone: (843) 236-6252
E-mail: mar228@mail.ru

НОВОСТИ НАУКИ

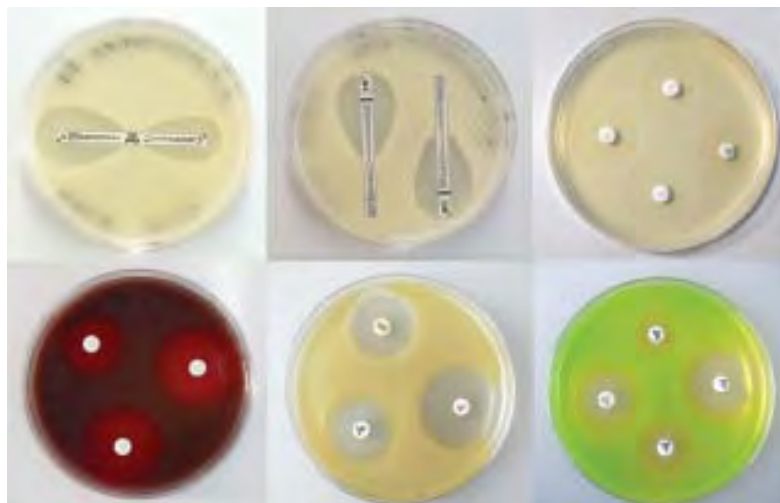
Агар Мюллера–Хинтон II

ФБУН ГНЦ ПМБ с конца 2017 года начал выпуск питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, сухой (агар Мюллера–Хинтон II).

Питательная среда соответствует требованиям современных нормативных документов EUCAST и клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к antimикробным препаратам».

Агар Мюллера–Хинтон II стандартизирован по содержанию ионов Ca, Mg, Mn и Zn, имеет минимальную концентрацию тимила/тимидина.

Питательная среда зарегистрирована в качестве медицинского изделия и имеет регистрационное удостоверение №РЗН 2017/5962 от 10 июля 2017 года.



Филогенетика, эволюция и филогеография *Bacillus anthracis*

Е.И.Еременко, С.В.Писаренко, Л.Ю.Аксенова, А.Г.Рязанова, А.М.Жиров,
О.В.Семенова, О.В.Бобрышева, Д.А.Ковалев, А.Н.Куличенко

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

Цель. Эволюционный и филогеографический анализ штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных на территории России и некоторых сопредельных стран.

Материалы и методы. Полные геномные последовательности 20 секвенированных в Ставропольском противочумном институте штаммов и 161 штамма, полученных из GenBank. Множественное выравнивание геномов 181 штамма *B. anthracis* и поиск SNP в коровом геноме провели с помощью программы REALPHY 1.10. Для байесовского MCMC филогенетического анализа молекулярных последовательностей и модели General Time Reversible (GTR) использовали программный пакет BEAST. Оценку результатов анализа и статистической достоверности выполнили в программе Tracer v1.6. Визуализацию полученных результатов провели в программах Figtree v1.4 (филогенетическое дерево) и Photoshop CC.

Результаты. Подтверждено высокое молекулярное разнообразие штаммов, выделенных на территории России и ряда сопредельных стран. В филогенетической структуре глобальной популяции *B. anthracis* эти штаммы относятся к транс-евразийской группе, субкладе Aust94 основной клады А и составляют кластер в основной кладе В. Хронология формирования главных филогенетических линий возбудителя сибирской язвы позволяет впервые постулировать предположение о происхождении и распространении *B. anthracis* с территории азиатской части России.

Заключение. Предполагается в дальнейшем определить региональные генетические маркеры, анализ которых в сопоставлении с соответствующей базой данных даст возможность в ходе эпидемиологического расследования установить происхождение штаммов, вызвавших вспышку сибирской язвы.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, филогенетическая структура, филогеография, эволюция

Для цитирования: Еременко Е.И., Писаренко С.В., Аксенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Жиров А.М., Семенова О.В., Бобрышева О.В., Ковалев Д.А., Куличенко А.Н. Филогенетика, эволюция и филогеография *Bacillus anthracis*. Бактериология. 2018; 3(2): 57–63. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-57-63

Phylogenetics, evolution and phylogeography of *Bacillus anthracis*

E.I.Eremenko, S.V.Pisarenko, L.Yu.Aksenova, A.G.Ryazanova, A.M.Zhirov,
O.V.Semenova, O.V.Bobrysheva, D.A.Kovalev, A.N.Kulichenko

Stavropol Plague Control Research Institute Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation

Objective. Evolutionary and phylogeographical analysis of the strains of *B. anthracis* isolated from territories of Russia and some adjacent countries.

Materials and methods. The full genomic sequences of 20 strains of *B. anthracis* sequenced in Stavropol Plague Control Research Institute and of 161 strains from the GenBank database. Multiple alignment of 181 *B. anthracis* strains' genomes and core genome SNP search were performed using REALPHY 1.10. program. For Bayesian MCMC phylogenetic analysis of molecular sequences and General Time Reversible (GTR) model program pack BEAST was used. Estimation of analysis results and statistic reliability were performed using Tracer v1.6. program. Visualization of results by Figtree v1.4 (phylogenetic tree) and Photoshop CC programs was achieved.

Results. The high molecular variety of strains isolated in Russia and some adjacent countries is confirmed. In phylogenetic structure of global population of *B. anthracis* those strains are mainly belonging to the trans-euroasian group and Aust94 subclade of the main clade of A and also forming a small cluster in a main B. The chronology of formation of the main phylogenetic lines of the causative agent of anthrax is established and the assumption of initial origin and distribution of *B. anthracis* from the territory of an Asian part of Russia is postulated for the first time.

Conclusions. It is supposed to define further regional genetic markers which analysis in comparison to the corresponding database will give the chance during epidemiological investigation to establish origin of the strains which have caused the outbreak of anthrax.

Keywords: *Bacillus anthracis*, phylogenetic structure, phylogeography, evolution

For citation: Eremenko E.I., Pisarenko S.V., Aksenova L.Yu., Ryazanova A.G., Zhirov A.M., Semenova O.V., Bobrysheva O.V., Kovalev D.A., Kulichenko A.N. Phylogenetics, evolution and phylogeography of *Bacillus anthracis*. Bacteriology. 2018; 3(2): 57–63. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-57-63

Для корреспонденции:

Еременко Евгений Иванович, доктор медицинских наук, профессор,
главный научный сотрудник лаборатории сибирской язвы
ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312
E-mail: ejer@mail.ru

Статья поступила 12.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

Evgeniy I. Eremenko, ScD (Medicine), professor,
chief researcher anthrax laboratory Stavropol Plague
Control Research Institute
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312
E-mail: ejer@mail.ru

The article was received 12.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

Возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* вызывает особо опасную зоонозную инфекцию и является агентом биологического оружия и терроризма. Сибирская язва глобально распространена и представляет проблему для ветеринарии и здравоохранения многих стран, включая Россию. Обширная территория, исторические факты прохождения через нее важных торговых путей и проявлений сибирской язвы предполагают достаточно высокий уровень молекулярного разнообразия штаммов *B. anthracis*, выделенных на территории России, установленный предыдущими работами по MLVA-генотипированию [1–3].

Филогенетическая структура глобальной популяции *B. anthracis*, полученная на основе молекулярного типирования методами MLVA и SNP-анализа, представлена тремя основными генетическими линиями – А, В и С с несколькими MLVA кластерами и 12 «каноническими» SNP группами [4–6]. Выделенные на территории России и ряда сопредельных стран штаммы *B. anthracis* входят в MLVA кластеры A1.a, A3.a, A4 линии А и B1 линии В [2, 3], но положение в структуре глобальной популяции на основе данных полногеномного секвенирования определено только для 10 штаммов [7]. В зарубежных работах, посвященных филогенетике и филогеографии *B. anthracis*, упоминаются только 3 вакцинных штамма российского происхождения.

Эволюция возбудителя сибирской язвы определяется изменениями генома, происходящими, прежде всего, в процессе инфекции в организме животных за счет мутационных событий [8]. Замены нуклеотидов имеют самую низкую скорость возникновения среди других мутаций, мало подвержены гомоплазии и эволюционно стабильны, поэтому SNP-анализ на основе полногеномного секвенирования стал основным методом изучения эволюции *B. anthracis*.

Историю эволюции и распределения штаммов возбудителя сибирской язвы можно представить на основе метода филогеографии, которую определяют как область исследования, касающуюся принципов и процессов, управляющих географическими распределениями генеалогических линий, особенно в пределах и среди близкородственных видов [9]. Ввиду отсутствия данных об эволюции и филогеографии штаммов возбудителя сибирской язвы российского происхождения проведение таких исследований представляется актуальным.

Целью данной работы был эволюционный и филогеографический анализ штаммов *B. anthracis*, выделенных на территории России и некоторых сопредельных стран.

Материалы и методы

Всего в работе использовали 181 штамм *B. anthracis*. Геномы 20 штаммов были секвенированы во ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора – СтавНИПЧИ (таблица). Данные о геномных последовательностях остальных 161 штамма получены из международной базы данных GenBank. Полные геномные последовательности двух штаммов, *Bacillus cereus* ATCC14579 и *Bacillus thuringiensis* 97-27, были использованы в качестве внешней группы. Эволюционно-филогеографический анализ на основе данных SNP полных геномов выполнен с использованием программного пакета BEAST методом байесовского MCMC филогенетического анализа молекулярных последователь-

ностей и модели General Time Reversible (GTR) [10]. Множественное выравнивание геномов 181 штамма *B. anthracis* и поиск SNP в коровом геноме проводили с помощью программы REALPHY 1.10 [11]. Поиск оптимальной модели замещения нуклеотидов проводили путем оценки работы 88 различных моделей замещения на матрице корового генома в программе jModelTest 2.1.1 [12].

Оценка результатов анализа и проверка статистической достоверности выполнена в программе Tracer v1.6. Визуализация полученных результатов выполнена с помощью программ Figtree v1.4 (филогенетическое дерево) и Photoshop CC.

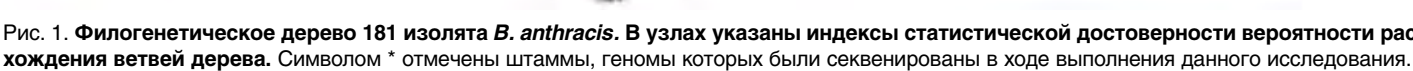
Результаты и обсуждение

Коровый геном 181 штамма *B. anthracis* состоит из 2765322 п.н., общее количество SNP, обнаруженных в коровом геноме, составляет 6041.

Дендрограмма кластерного анализа коровых SNP 181 штамма *B. anthracis* приведена на рисунке 1. Она отражает принятую структуру глобальной популяции *B. anthracis* с делением на три основные генетические линии (А, В, С) и 12 групп *canSNP*. Штаммы из коллекции СтавНИПЧИ распределялись в 5 кластеров линии А и 1 кластер линии В. Штамм

Таблица. Штаммы *B. anthracis* из коллекции СтавНИПЧИ, использованные в работе

№№	Штамм <i>B. anthracis</i>	Место выделения	Год выделения	Источник выделения
1	1051/35	Россия, г. Уфа	1935	Труп лошади
2	12/16	Россия, Республика Дагестан	1957	Человек
3	14/41	Россия, Республика Дагестан	1963	Человек
4	1	Украина, г. Львов	1967	Человек
5	1(CO)	Россия, РСО-А	1968	Труп КРС
6	228/269	Россия, КБР	1977	Блохи горного суслика
7	312/163	Азербайджан	1978	Почва
8	140П	Россия, Тверская область	1979	Почва
9	И-271	Россия, Якутская АССР	1980	Почва
10	737/10	Грузия	1984	Человек
11	1266	Россия, Ставропольский край	2006	Почва
12	1269	Россия, РСО-А	2007	Человек
13	1284	Россия, г. Омск	2010	Пельмени
14	1307	Россия, Ставропольский край	2013	Человек
15	1322	Россия, Ставропольский край	2013	Труп овцы
16	1342/12	Россия, Ямало-Ненецкий автономный округ	2016	Человек
17	1339/24	Россия, Ямало-Ненецкий автономный округ	2016	Труп оленя
18	140Псар-б/м	Россия, г. Ставрополь, Научно-исследовательский противочумный институт Кавказа и Закавказья	1990	Производный от штамма 140П
19	81/1	Россия, Ставропольский край	1969	Человек
20	СТИ-1	СССР, Санитарно-технический институт (СТИ)	1940	Вакцинный штамм



И-271, выделенный в Якутии, единственный в группе A.Br.001/002, кластеризовался со штаммами, происходящими из Восточной, Южной, Юго-Восточной Азии и Европы. Штаммы, выделенные в Грузии и Азербайджане, входили наряду с другими грузинскими штаммами и штаммами из Индии и Австралии в группу A.Br.Aust94. Семь штаммов, выделенных на территории европейской части России, входили в один кластер с российским вакцинным штаммом первой вакцины Ценковского (Tziankovskii-I), китайским вакцинным штаммом Cvac02 и штаммом из Словакии. В другой кластер, также принадлежащий к группе A.Br.008/009, вместе с грузинскими штаммами входили два российских вакцинных штамма, СТИ-1 и 55-ВНИИВИМ. Семь штаммов, выделенных в Сибири и Дагестане, и корейский штамм HYU01 входили вместе с субкластером B.Br.Kruger в группу B.Br.001/002.

С целью оценить временные рамки формирования генотипов и подгенотипов мы осуществили датировку филогенетического дерева. Для датировки были использованы известные данные о времени изоляции штаммов *B. anthracis*. Нуклеотидные последовательности штаммов, для которых нам не удалось достоверно установить год изоляции, были исключены из матрицы выравнивания корового генома и в дальнейшем анализе не использовались. Из дальнейшего анализа также были исключены последовательности вакцинных и лабораторных штаммов.

Провели эволюционно-филогеографический анализ 97 природных штаммов *B. anthracis*, включая 17 из коллекции СтавНИПЧИ, секвенированных в институте (таблица, №№1–17).

Распределение штаммов возбудителя сибирской язвы в масштабах планеты связано с двумя процессами. Первым является историческое расселение и миграция людей. Второй процесс связан с развитием торговли, в частности, продуктами животноводства, контаминированными спорами *B. anthracis*, между отдаленными географическими областями [4]. Сегодняшняя привязка некоторых MLVA-генотипов *B. anthracis* к определенным регионам была продемонстрирована во многих работах, но проследить эволюционную историю возбудителя сибирской язвы, в частности в Северной Америке, удалось только на основе анализа нескольких тысяч SNP в геномах сотен штаммов, однако разными авторами получены противоречивые данные [13, 14].

Сопоставив данные о географических регионах изоляции штаммов, мы попытались описать историческую модель распространения возбудителя.

По данным проведенного анализа, первая дивергенция предков штаммов произошла в середине X тысячелетия (9643 г.) до нашей эры, завершившись формированием генетической линии С и предковой ветви линий А и В (рис. 2).

Полученные результаты не противоречат моделям «молекулярных часов», основанным на синонимичных заменах в масштабах всего генома, которые показывают, что в среднем голоцене (6127–3064 гг. до н.э.) произошло массовое распространение линии А [14], хотя по другим данным это произошло в более раннем периоде [13].

Вторая дивергенция произошла в середине V тысячелетия (4643 г.) до н.э. и завершилась формированием линий А и В, дальнейшая эволюция которых происходила параллельно. В начале X века до н.э. произошло формирование группы

A.Br.005/006, штаммы которой были выделены в странах Африки.

В конце VIII века до н.э. сформировалась подгруппа A.Br.Vollum. В нашем исследовании она представлена штаммами, выделенными в Пакистане и США.

В середине III столетия до н.э. произошло разделение линии В с формированием двух групп: B.Br.CNEVA – штаммы из Франции, Австрии, Германии и группы B.Br.001/002, штаммы которой были выделены преимущественно в России, а также субкластера B.Br.Kruger. География изоляции штаммов этой линии довольно обширна: Башкирия (1935), Дагестан (1957, 1963), Тверская область (1979), Ямало-Ненецкий автономный округ (2016), а также Южная Корея (2009).

В середине II в. до н.э. сформировалась группа A.Br.008/009. Штаммы этой линии были изолированы в Европе (Англия, Франция, Германия, Италия, Греция), в странах Азии (Турция, Пакистан), на Кавказе (Россия, Грузия) и в США.

В то же время (середина II в. до н.э.) произошло формирование группы A.Br.WNA, в нашем исследовании она представлена одним штаммом, выделенным в США (New Mexico, 1956).

Группа A.Br.003/004 сформировалась во второй половине II в. до н.э. Она включает штаммы из Северной и Южной Америки.

Во второй половине первого столетия нашей эры произошло формирование двух групп линии А возбудителя: A.Br.001/002 и A.Br.Aust94.

Штаммы группы A.Br.001/002 имеют широкое географическое распространение. Используемые в исследовании штаммы были выделены в США, Бразилии, странах Европы, Восточной и Юго-Восточной Азии и в России (Якутия, 1980).

Штаммы группы A.Br.Aust94 были выделены в Австралии, Индии, ЮАР, США и на Кавказе (Грузия, Азербайджан).

Штаммы, изолированные на территории России, принадлежат к группе B.Br.001/002 линии В и группам A.Br.001/002 и A.Br.008/009 линии А. Штаммы, принадлежащие к линии B.Br.001/002, были выделены в Башкирии, Дагестане, Тверской области, Тюменской области и Ямало-Ненецком автономном округе. Штаммы из Ставропольского края, Северной Осетии и Кабардино-Балкарии принадлежат к группе A.Br.008/009. Регионы изоляции штаммов линии A.Br.008/009 расположены довольно близко друг к другу (Ставропольский край и республики Северного Кавказа), в отличие от регионов изоляции штаммов линии B.Br.001/002. Штамм И-271, изолированный в Якутии в 1980 г., относится к линии A.Br.001/002, которая сформировалась во второй половине I в. н.э. Примечательно, что лишь один из исследуемых нами российских штаммов был отнесен к этой линии. К ней также принадлежат штаммы, циркулирующие в Европе, Восточной Азии и США. Можно предположить, что проникновение представителей линии A.Br.001/002 на территорию России происходило из Восточной Азии; для подтверждения этого предположения, а также определения путей проникновения в Россию штаммов двух других линий требуется изучение полных геномов большего количества (100 и более) штаммов возбудителя сибирской язвы, изолированных в России и странах СНГ. Согласно данным SNP и VNTR типирования, в России на территории Дагестана, Ингушетии, Кабардино-Балкарской, Северной Осетии-

Алании и Чеченской республики были выделены штаммы, принадлежащие, как и штаммы из Грузии и Азербайджана, к группе A.Br.Aust94, а на территории Туркменистана – штаммы группы A.Br.Vollum, однако для них отсутствуют данные о полных геномных последовательностях.

В результате проведенной работы впервые получено представление о филогеографии штаммов возбудителя сибирской язвы, выделенных на территории России и некоторых стран СНГ. Подтверждено высокое молекулярное разнообразие изолятов из этих географических областей и показано распределение штаммов в филогенетической структуре глобальной популяции *B. anthracis*. Распределение штаммов возбудителя сибирской язвы в масштабах планеты связано с двумя процессами. Первым является историче-

ское расселение и миграция людей. Вторым процесс связан с развитием торговли, в частности, продуктами животноводства, контаминированными спорами *B. anthracis*, между удаленными географическими областями [4]. Характер распределения штаммов из России и некоторых стран СНГ в филогенетической структуре глобальной популяции *B. anthracis*, преимущественно относящихся к трансевразийской группе (TEA) [6] и субкладе Aust94 основной клады А, представляется закономерным. Он определяется уникальностью территории России, занимающей большую часть евразийского континента и распространяющейся с востока Европы до тихоокеанского побережья Азии и граничащей со странами Восточной, Северной Европы, Восточной, Центральной и Западной Азии, существованием исторических

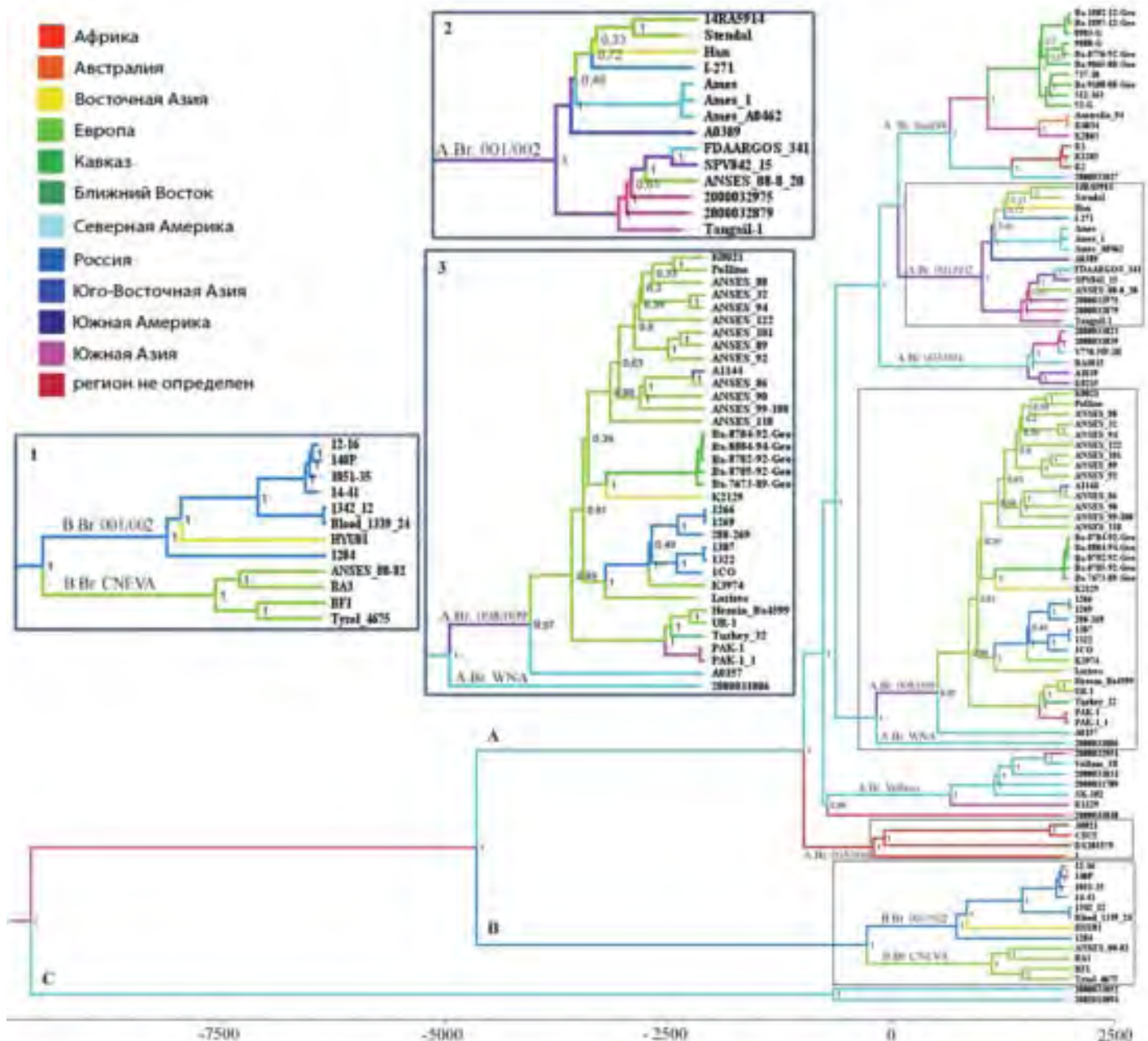


Рис. 2. Реконструкция эволюции *B. anthracis* на основе SNP филогении корового генома 97 штаммов. Единичные измерения по шкале времени – годы, отрицательные значения соответствуют времени до нашей эры. В узлах указаны индексы статистической достоверности вероятности расхождения ветвей дерева. В блоках 1, 2, 3 выделены ветви дерева, которым принадлежат штаммы, выделенные в России.

торговых путей (Великий шелковый путь, путь «из варяг в греки»), проходивших через территорию России.

Субклада Aust94 получила свое название по штамму *B. anthracis*, выделенному в Австралии в 1994 г. В нее входит, кроме него и штаммов из Грузии и Азербайджана, изолят из Индии. Это соответствует предположению о завозе *B. anthracis* в Австралию существовавшим торговым морским путем из Индии и данным о принадлежности многих штаммов из Грузии к этой группе [15].

В кластер B.Br.001/002 основной клады В вошло несколько штаммов, выделенных в Сибири, на Северном Кавказе и в европейской части России, а также штамм из Южной Кореи. Интересно происхождение штамма *B. anthracis* 1, выделенного на Украине от больного, заразившегося сибирской язвой в результате контакта с шерстью, импортированной из Эфиопии, который входит в один кластер с еще 4 штаммами африканского происхождения в группе A.Br.005/006.

Таким образом, установлена хронология формирования главных филогенетических линий возбудителя сибирской язвы и постулировано предположение об происхождении и распространении штаммов с территории азиатской части России. Линия С является самой малочисленной линией *B. anthracis*. Штаммы, вошедшие в нее, были изолированы на территории США. Согласно историческим данным, период около 9700 (+/- 99) лет до н.э. относят к позднему дриасу – границе между плейстоценом и голоценом. По мнению историков, в это время практически завершилась миграция предков современных индейцев из Азии в Америку. Международная группа исследователей (в которую входили сотрудники Института цитологии и генетики СО РАН) пришла к выводу, что генетической родиной первых американцев следует считать Алтай [16]. Оттуда, по всей видимости, вышли предки индейцев (а также, вероятно, чукчей, коряков и др.), расселившиеся по Сибири и в конечном итоге добравшиеся до Америки. Одним из предполагаемых путей переселения считается так называемый «Берингийский мост» – древний широкий перешеек между Америкой и Азией на месте нынешнего Берингова пролива, исчезнувший более 12 тыс. лет назад. Вероятно, что предки нынешних штаммов *B. anthracis*, принадлежащих к линии С, были занесены на территорию Северной Америки именно в этот период. Причина того, что эта линия не получила распространения, остается не выясненной.

Полученные данные позволяют также в дальнейшем определить региональные генетические маркеры, анализ которых в сопоставлении с соответствующей базой данных даст возможность в ходе эпидемиологического расследования установить происхождение штаммов, вызвавших вспышку сибирской язвы.

Литература

1. Цыганкова ОИ, Еременко ЕИ, Брюханов АФ, Абгарян АГ, Ефременко ВИ, Рязанова АГ. Генотипирование штаммов сибиреязвенного микроба на территории стран СНГ. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2003;1:51-6.
2. Еременко ЕИ, Рязанова АГ, Цыганкова ОИ, Цыганкова ЕА, Буравцева НП, Куличенко АН. Генотипическое разнообразие штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных в регионе Кавказа. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012;2:26-9.

3. Шишкова НА, Мокриевич АН, Платонов МЕ, Светоч ТЭ, Маринин ЛИ. Изучение генетического разнообразия штаммов сибиреязвенного микроба из коллекции ГНЦ ПМБ. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;2(104):60-5.
4. Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, Okinaka RT, Hugh-Jones ME, Ravel J, et al. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. PLoS One. 2007 May 23;2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461
5. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 2000 May;182(10):2928-36.
6. Pilo P, Frey J. *Bacillus anthracis*: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. Infect Genet Evol. 2011 Aug;11(6):1218-24. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.05.013
7. Куличенко АН, Еременко ЕИ, Рязанова АГ, Аксенова ЛЮ, и др. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2017;1: 94-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99
8. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. Infect Genet Evol. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005
9. Avise JC. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, 2000, 464 p.
10. Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. PLoS Computational Biology. 2014;10(4):e1003537. DOI:10.1371/journal.pcbi.1003537
11. Bertels F, Silander OK, Pachkov M, Rainey PB, Nimwegen E. Automated reconstruction of whole genome phylogenies from short sequence reads. Mol Biol Evol. 2014 May;31(5):1077-88. DOI: 10.1093/molbev/msu088
12. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat Methods. 2012 Jul 30;9(8):772. doi: 10.1038/nmeth.2109.
13. Kenefic LJ, Pearson T, Okinaka RT, Schupp JM, Wagner DM, Hoffmaster AR, et al. Pre-Columbian Origins for North American Anthrax. PLoS One. 2009;4(3):e4813. DOI: 10.1371/journal.pone.0004813.
14. Vergnaud G, Girault G, Thierry S, Pourcel C, Madani N, Blouin Y. Comparison of French and Worldwide *Bacillus anthracis* Strains Favors a Recent, Post-Columbian Origin of the Predominant North-American Clade. PLoS One. 2016 Feb 22;11(2):e0146216. DOI: 10.1371/journal.pone.0146216.
15. Khmaladze E, Birdsell DN, Naumann AA, Hochhalter CB, Seymour ML, Nottingham R, et al. Phylogeography of *Bacillus anthracis* in the Country of Georgia Shows Evidence of Population Structuring and Is Dissimilar to Other Regional Genotypes. PLoS One. 2014 Jul 21;9(7):e102651. DOI: 10.1371/journal.pone.0102651.
16. Reich D, Patterson N, Campbell D, Tandon A, Mazieres S, Ray N, et al. Reconstructing Native American population history. Nature. 2012 Aug 16;488(7411): 370-4. DOI: 10.1038/nature11258

References

1. Tsigankova OI, Eremenko EI, Brukhanov AF, Abgaryan AG, Efremenko VI, Ryazanova AG. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains isolated on the territory of CIS countries. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2003;1:51-6. (In Russian).
2. Eremenko EI, Ryazanova AG, Tsygankova OI, Tsygankova EA, Buravtseva NP, Kulichenko AN. Genotype diversity of *Bacillus anthracis* strains isolated from the Caucasus region. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2012;2:26-9. (In Russian).
3. Shishkova NA, Mokrievich AN, Platonov ME, Svetoch TE, Marinin LI. Study of the Genetic Diversity of the Anthrax Microbe Strains from the Collection of

- SRC AMB. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2010;2(104):60-5. (In Russian).
4. Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, Okinaka RT, Hugh-Jones ME, Ravel J, et al. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. PLoS One. 2007 May 23;2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461
 5. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 2000 May;182(10):2928-36.
 6. Pilo P, Frey J. *Bacillus anthracis*: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. Infect Genet Evol. 2011 Aug;11(6):1218-24. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.05.013
 7. Kulichenko AN, Eremenko EI, Ryazanova AG, Aksenova LYu, Kovalev DA, Pisarenko SV, et al. Biological properties and molecular-genetic characteristics of bacillus anthracis strains, isolated during the outbreak of anthrax in the yamalo-nenets autonomous district in 2016. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2017;1:94-9. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99
 8. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. Infect Genet Evol. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005
 9. Avise JC. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, 2000, 464 p.
 10. Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. PLoS Computational Biology. 2014;10(4):e1003537. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003537
 11. Bertels F, Silander OK, Pachkov M, Rainey PB, Nimwegen E. Automated reconstruction of whole genome phylogenies from short sequence reads. Mol Biol Evol. 2014 May;31(5):1077-88. DOI: 10.1093/molbev/msu088
 12. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat Methods. 2012 Jul 30;9(8):772. DOI: 10.1038/nmeth.2109.
 13. Kenefic LJ, Pearson T, Okinaka RT, Schupp JM, Wagner DM, Hoffmaster AR, et al. Pre-Columbian Origins for North American Anthrax. PLoS One. 2009;4(3):e4813. DOI: 10.1371/journal.pone.0004813.
 14. Vergnaud G, Girault G, Thierry S, Pourcel C, Madani N, Blouin Y. Comparison of French and Worldwide *Bacillus anthracis* Strains Favors a Recent, Post-Columbian Origin of the Predominant North-American Clade. PLoS One. 2016 Feb 22;11(2):e0146216. DOI: 10.1371/journal.pone.0146216.
 15. Khmaladze E, Birdsell DN, Naumann AA, Hochhalter CB, Seymour ML, Nottingham R, et al. Phylogeography of *Bacillus anthracis* in the Country of Georgia Shows Evidence of Population Structuring and Is Dissimilar to Other Regional Genotypes. PLoS One. 2014 Jul 21;9(7):e102651. DOI: 10.1371/journal.pone.0102651.
 16. Reich D, Patterson N, Campbell D, Tandon A, Mazieres S, Ray N, et al. Reconstructing Native American population history. Nature. 2012 Aug 16;488(7411):370-4. DOI: 10.1038/nature11258

Информация о соавторах:

Писаренко Сергей Владимирович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312
E-mail: pisarenko_sv@mail.ru

Аксенова Людмила Юрьевна, кандидат медицинских наук, врач-бактериолог лаборатории сибирской язвы ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Рязанова Алла Геннадьевна, кандидат медицинских наук, врач-бактериолог, заведующая лабораторией сибирской язвы ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Жилов Андрей Михайлович, младший научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Семенова Ольга Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории сибирской язвы ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Бобрышева Ольга Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Ковалев Дмитрий Анатольевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Куличенко Александр Николаевич, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Information about co-authors:

Sergey V. Pisarenko, PhD (Chem.), senior researcher laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312
E-mail: pisarenko_sv@mail.ru

Lyudmila Yu. Aksenova, PhD (Med.), doctor-bacteriologist anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Alla G. Ryazanova, PhD (Med.), doctor-bacteriologist, head of anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Andrey M. Zhilov, junior researcher laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Olga V. Semenova, PhD (Biol.), researcher anthrax laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Olga V. Bobrysheva, junior researcher laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Dmitry A. Kovalev, PhD (Chem.), head of laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Alexander N. Kulichenko, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, doctor of medical sciences, professor, director, Stavropol Plague Control Research Institute
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Выявление стафилококков при использовании современных импортозамещающих питательных сред

А.П.Шепелин, А.Б.Сергеева, О.В.Полосенко

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

Обзор посвящен вопросам бактериологической диагностики стафилококковых инфекций с применением полного набора отечественных питательных сред, их сравнительным характеристикам по биологическим показателям, подтверждению принадлежности типичных колоний к коагулазоположительным стафилококкам, а также необходимости лабораторного контроля в разных областях производства на наличие стафилококков.

Ключевые слова: стафилококки, диагностические питательные среды

Для цитирования: Шепелин А.П., Сергеева А.Б., Полосенко О.В. Выявление стафилококков при использовании современных импортозамещающих питательных сред. Бактериология. 2018; 3(2): 64–71. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-64-71

Stafilococks identification by using modern import-replacing nutrient media

A.P.Shepelin, A.B.Sergeeva, O.V.Polosenko

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

The review is devoted to the issues of bacteriological diagnostics of staphylococcal infections using a full set of domestic nutrient media, their comparative characteristics by biological indices, confirmation of the belonging of typical colonies to coagulase-positive staphylococci, and the need for laboratory control in various fields of production for the presence of staphylococci.

Keywords: staphylococci, diagnostic growth media

For citation: Shepelin A.P., Sergeeva A.B., Polosenko O.V. Stafilococks identification by using modern import-replacing nutrient media. Bacteriology. 2018; 3(2): 64–71. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-64-71

О живление интереса микробиологов к идентификации стафилококков вызвано расширением видового состава данного рода, и бесспорно доказана патогенетическая роль не только коагулазоположительных, но и коагулазоотрицательных стафилококков (КОС) [1].

S. aureus остается одним из важнейших возбудителей инфекций человека, вызывая широкий спектр заболеваний: от легких и средней тяжести поражений кожи и мягких тканей до угрожающих жизни пневмонии, сепсиса, септикопиемии и синдрома токсического шока. Золотистый стафилококк способен поражать практически любой орган и ткань в организме. Это связано с адгезивными свойствами, т.е. способностью прикрепляться к клеткам тканей орга-

низма. Политропность *S. aureus* выражена способностью вызывать гнойно-воспалительные процессы в любой части организма.

Инфекции, вызванные коагулазоотрицательными стафилококками, развиваются чаще всего у ослабленных больных со сниженной иммунологической защитой, у новорожденных, онкологических больных, при длительной антибактериальной терапии.

Эпидермальный коагулазоотрицательный стафилококк служит причиной нозокомиального сепсиса и пневмоний у новорожденных, осложнений после кардиологических операций, может быть возбудителем менингита, воспалительных заболеваний мочевого тракта у ослабленных больных [2].

Для корреспонденции:

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, г.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0020
E-mail: shepelin@obolensk.org

Статья поступила 16.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

For correspondence:

Anatoly P. Shepelin, Sc.D. (Bio.), deputy director for science and production, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0020
E-mail: shepelin@obolensk.org

The article was received 16.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

Сапрофитный стафилококк обнаруживается в слизистой среде мочеиспускательного канала, провоцирует развитие цистита и дизурических расстройств, реже – пиелонефрита и эндокардита.

Все эти факторы создают необходимость лабораторного контроля в разных областях производства, медицинских учреждений, различных объектов в санитарной и клинической микробиологии.

Актуальность совершенствования методических подходов к идентификации стафилококков связана с расширением видового состава данного рода и увеличивающимся значением в патогенезе различных заболеваний, что относится не только к коагулазоположительным, но и коагулазоотрицательным стафилококкам.

При определении таксономического положения выделенных клинически значимых стафилококков основным является бактериологический метод. Этот метод включает в себя использование накопительных и элективных питательных сред и создание условий культивирования для преимущественного накопления в культуре нужных форм микробов, способы получения чистых культур из отдельных колоний или клеток микроорганизмов [3].

Организация профилактики стафилококковых инфекций и изучение путей их распространения невозможны без микробиологических исследований и во многом зависят от высокого качества работы лаборатории.

Получение корректных данных возможно только при грамотном выполнении всех звеньев бактериологического исследования: от взятия клинического материала, транспортировки его в бактериологическую лабораторию, идентификации возбудителя до определения его чувствительности к антибиотикам и интерпретации полученных результатов.

Выделение чистой культуры проводят с учетом ее культуральных особенностей. Стафилококковая инфекция обладает свойствами галофильности, т.е. способностью расти в присутствии высоких концентраций хлористого натрия. Для выделения стафилококков из исследуемого материала используют элективно-солевой агар, маннитол-агар (питательная среда № 10), стафилококк-агар [4].

Питательные среды для выделения стафилококков должны в соответствии с заявленными в нормативной докумен-

тации показателями качества давать достоверные и сопоставимые результаты.

На всех питательных средах для выделения стафилококков были изучены культурально-морфологические свойства коагулазоположительных тест-штаммов *S. aureus* и микробов-ассоциантов с целью сравнения результатов, полученных на неселективной питательной среде. Посев тест-штаммов осуществлялся на среды с соблюдением условия равнозначности. Посевы инкубировались при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 44–48 ч с последующей визуальной оценкой ростовых и ингибирующих свойств питательных сред по количеству, диаметру и морфологии колоний.

Результаты биологического контроля качества питательных сред для выделения стафилококков представлены в таблице.

Из таблицы видно, что среды ФБУН ГНЦ ПМБ для выделения стафилококков обеспечивают хорошие ростовые свойства стафилококков и ингибирующий эффект по отношению к отдельным видам микроорганизмов. При учете ростовых свойств питательных сред отмечено, что селективные свойства всех питательных сред для выделения стафилококков по количеству выросших колоний тест-штаммов *S. aureus* не уступают питательному агару, что свидетельствует о высокой чувствительности сред.

На обычных плотных питательных средах (ГРМ-агар, МПА, питательная среда №1) стафилококки образуют непрозрачные, круглые (2–4 мм в диаметре) ровные колонии, окрашенные в цвет липохромного пигмента (кремовый, желтый, оранжевый) (рис. 1, 2).

Стафилококки обладают высокой биохимической активностью [5], образуют различные ферменты, во многом определяющие патогенность. Каталазоположительны (рис. 3), оксидазоотрицательны, углеводы ферментируют до кислоты без газа, разжижают желатин с образованием воронки, не продуцируют сероводород. По наличию коагулазы делятся на две группы: коагулазоположительные и коагулазоотрицательные.

Рост *S. epidermidis* и *S. aureus* «Виотко» на питательной среде для выделения стафилококков (Стафилококк-агар) производства ФБУН ГНЦ ПМБ представлен на рис. 4, А, Б. Стафилококк-агар обеспечивает рост стафилококков через



Рис. 1. Наличие пигментов *S. aureus* ATCC 6538-Р и *S. aureus* Wood-46 на питательной среде ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ).

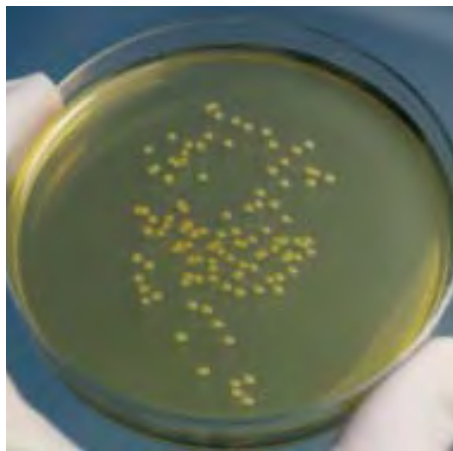


Рис. 2. Рост тест-штамма *S. aureus* ATCC 6538-Р на питательной среде №1 ГРМ.

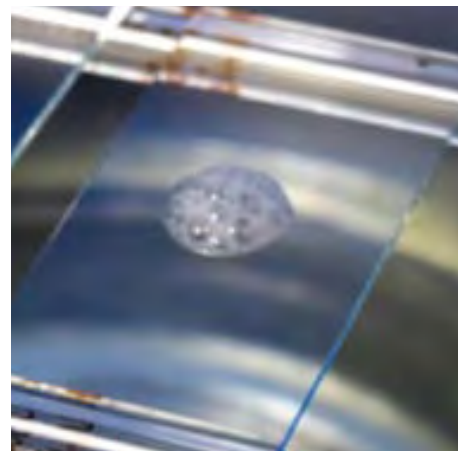


Рис. 3. Тест на каталазу *S. aureus*.

Таблица. Характеристика питательных сред для выделения стафилококков по биологическим показателям

№ п/п	Тест-штаммы, разведение	Агар Байрд–Паркера с добавлением 2%-го раствора теллурита калия и желточной эмульсии	Агар Фогеля–Джонсона с добавлением 2%-го раствора теллурита калия	Питательная среда для выделения стафилококков (Стафилококк-агар)	Питательная среда № 10 ГРМ для идентификации <i>Staphylococcus aureus</i>	Питательная среда для культивирования и подсчета общего числа бактерий (питательная среда № 1 ГРМ)
Результаты биологического контроля (количество, диаметр колоний, морфология)						
1.	<i>S. aureus</i> «Виотко» 10 ⁻⁶	40 2,0–3,0 черного цвета, лецитиназная активность +	46 2,5–3,0 черного цвета, окруженные желтой зоной	42 2,0–4,0 выпуклые, блестящие, непрозрачные со светло-желтым оттенком	43 2, 0–4,0 выпуклые, золотисто- желтого цвета, окруженные желтыми зонами	45 2,5–4,0 непрозрачные, блестящие, с ровными краями
2.	<i>S. aureus</i> Wood-46 10 ⁻⁶	48 1,5–2,5 черного цвета, лецитиназная активность +	50 1,5–2,5 черного цвета, окруженные желтой зоной	45 1,5–2,5 выпуклые, блестящие, непрозрачные со светло-желтым оттенком	50 1,5–2,0 выпуклые, золотисто- желтого цвета, окруженные желтыми зонами	50 2,5–3,0 непрозрачные, блестящие, с ровными краями
3.	<i>S. aureus</i> 6538-P 10 ⁻⁶	51 1,5–2,5 черного цвета, лецитиназная активность +	56 1,5–2,5 черного цвета, окруженные желтой зоной	55 1,5–2,5 выпуклые, блестящие, непрозрачные со светло-желтым оттенком	50 1,5–2,0 выпуклые, золотисто- желтого цвета, окруженные желтыми зонами	50 2,5–3,0 непрозрачные, блестящие, с ровными краями
4.	<i>S. aureus</i> «Лоссмано» 10 ⁻⁶	59 1,5–2,5 черного цвета, лецитиназная активность +	51 1,5–2,5 черного цвета, окруженные желтой зоной	54 1,5–2,5 выпуклые, блестящие, непрозрачные со светло-желтым оттенком	58 1,5–2,0 выпуклые, золотисто- желтого цвета, окруженные желтыми зонами	56 2,5–3,0 непрозрачные, блестящие, с ровными краями
5.	<i>S. aureus</i> 25923 10 ⁻⁶	49 1,5–2,5 черного цвета лецитиназная активность +	47 1,5–2,5 черного цвета, окруженные желтой зоной	46 1,5–2,5 выпуклые, блестящие, непрозрачные со светло-желтым оттенком	49 1,5–2,0 выпуклые, золотисто- желтого цвета, окруженные желтыми зонами	48 2,5–3,0 непрозрачные, блестящие, с ровными краями
6.	<i>S. aureus</i> ATCC 700699 10 ⁻⁶	48 1,5–2,5 черного цвета, лецитиназная активность +	50 1,5–2,5 черного цвета, окруженные желтой зоной	45 1,5–2,5 выпуклые, блестящие, непрозрачные со светло-желтым оттенком	50 1,5–2,0 выпуклые, золотисто- желтого цвета, окруженные желтыми зонами	50 2,5–3,0 непрозрачные, блестящие, с ровными краями
7.	<i>S. aureus</i> ATCC 700699 BAA-1707 10 ⁻⁶	51 1,5–2,5 черного цвета, лецитиназная активность +	51 1,5–2,5 черного цвета, окруженные желтой зоной	45 1,5–2,5 выпуклые, блестящие, непрозрачные со светло-желтым оттенком	50 1,5–2,0 выпуклые, золотисто- желтого цвета, окруженные желтыми зонами	52 2,5–3,0 непрозрачные, блестящие, с ровными краями
8.	<i>S. aureus</i> ATCC 700699 BAA-1720 10 ⁻⁶	46 1,5–2,5 черного цвета, лецитиназная активность +	47 1,5–2,5 черного цвета, окруженные желтой зоной	45 1,5–2,5 выпуклые, блестящие, непрозрачные со светло-желтым оттенком	44 1,5–2,0 выпуклые, золотисто- желтого цвета, окруженные желтыми зонами	45 2,5–3,0 непрозрачные, блестящие, с ровными краями
9.	<i>P. mirabilis</i> 3177 10 ⁻⁴	коричневого цвета в R-форме	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Точечные колонии при отсутствии роения	Сплошной рост, роение
10.	<i>P. aeruginosa</i> 27/99 10 ⁻⁴	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Сплошной рост, сине- зеленый пигмент
11.	<i>E. coli</i> ATCC 25922 10 ⁻⁴	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Сплошной рост
12.	<i>S. typhimurium</i> 79 10 ⁻⁴	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Сплошной рост
13.	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433 (NCTC 775) 10 ⁻⁴	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Сплошной рост
14.	<i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59) 10 ⁻⁴	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Сплошной рост
15.	<i>P. vulgaris</i> HX 19 222 10 ⁻⁴	Колонии коричневого цвета в R-форме	Отсутствие роста	Круглые прозрачные колонии диаметром менее 0,5 мм при отсутствии роения	Точечные колонии при отсутствии роения	Сплошной рост роение
16.	<i>B. subtilis</i> 6633 10 ⁻⁴	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Сплошной рост

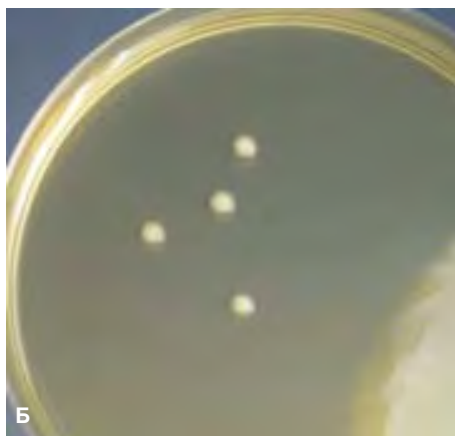
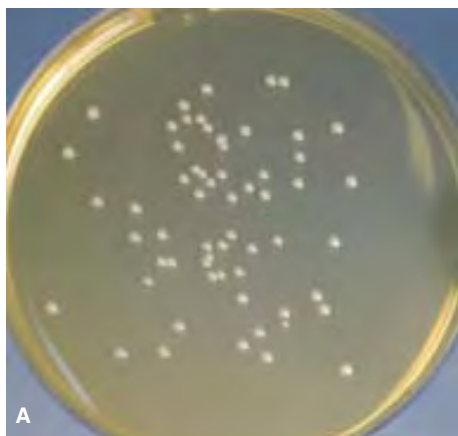


Рис. 4. А – рост тест-штамма *S. epidermidis* на Стафилококк-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ); Б – рост тест-штамма *S. aureus* «Виотко» на Стафилококк-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ).

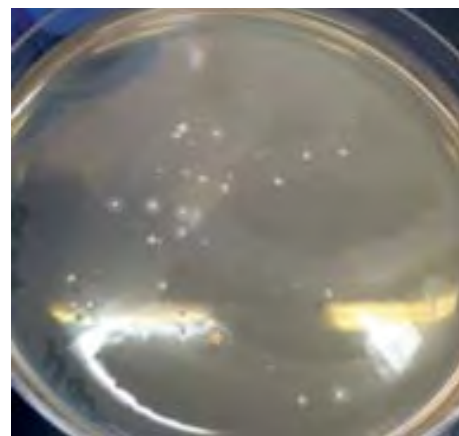


Рис. 5. Положительная лецитовителлазная реакция при росте на Стафилококк-агаре с добавлением желточной эмульсии.

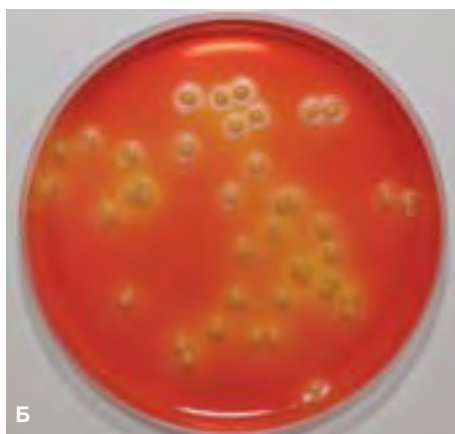
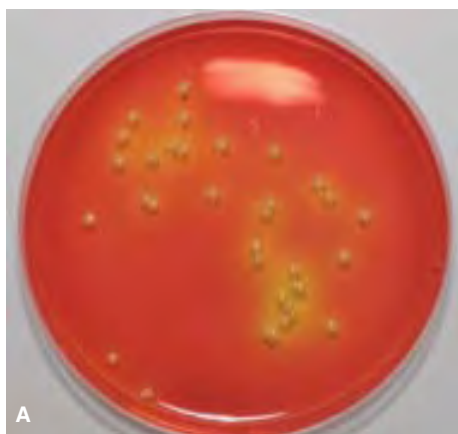


Рис. 6. А – рост тест-штамма *S. aureus* FDA 209-P (ATCC 6538-P) на питательной среде №10 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ); Б – лецитиназный тест *S. aureus* FDA 209-P на питательной среде №10 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ) с добавлением желточной эмульсии.



Рис. 7. Биологический контроль тест-штамма *S. aureus* FDA 209-P (ATCC 6538-P) на маннит-солевом агаре.

48 ± 2 ч инкубации при температуре 37 ± 1°C и полностью подавляет рост эшерихий и синегнойной палочки.

В схемах исследования на присутствие патогенного стафилококка с плотных селективных сред пересевают прежде всего колонии, дающие положительную лецитовителлазную реакцию (образование радужного венчика) (рис. 5). Такая реакция патогенных стафилококков (лецитиназный тест) проявляется в способности расщеплять яичный желток в средах с желточной эмульсией.

При отсутствии на чашках таких колоний дальнейшему исследованию подвергаются пигментированные колонии, схожие по морфологии со стафилококком. При одновременном наличии на чашках колоний стафилококка, отличающихся по пигменту, следует пересевать не менее двух колоний различного вида [4].

Для селективного обнаружения патогенных маннитположительных стафилококков, идентификации стафилококков при контроле микробной загрязненности нестерильных лекарственных средств по признаку ферментации маннита, а так же при проведении исследований в санитарной и клинической микробиологии рекомендуется к использованию питательная среда №10 и агар Фогеля–Джонсона [4, 6].

Золотисто-желтые колонии, окруженные желтыми зонами, на питательной среде №10 свидетельствуют о наличии *S. aureus*. На рис. 6 представлен рост тест-штамма *S. aureus* FDA 209-P (ATCC 6538-P) на питательной среде № 10 ГРМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ и на этой же среде с добавлением желточной эмульсии (радужный венчик).

Для микробиологического контроля продуктов питания может быть использован готовый к применению маннит-солевой агар, разлитый в чашки Петри.

С целью внедрения в ГНЦ ПМБ технологии по производству готовых питательных сред была установлена экспериментальная линия по розливу питательных сред в чашки Петри. Все сухие питательные среды, производимые в ГНЦ ПМБ, выпускаются в соответствии с утвержденной документацией и имеют определенные физико-химические и биологические показатели. Технология изготовления готовых питательных сред позволяет полностью сохранить требуемые показатели, а также значительно сокращает общее время для анализа (питательные среды приготовлены и отконтролированы на предприятии-изготовителе).

Поэтому при внедрении новой технологии и проведении мониторинга в перечень наиболее значимых питательных

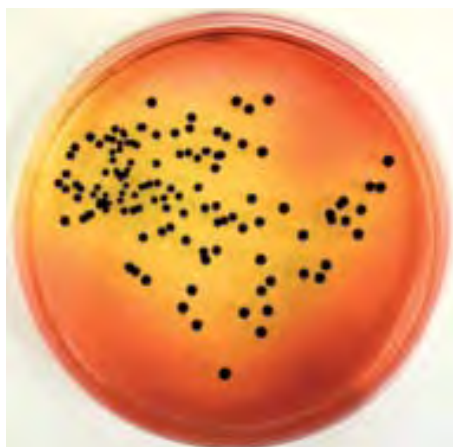
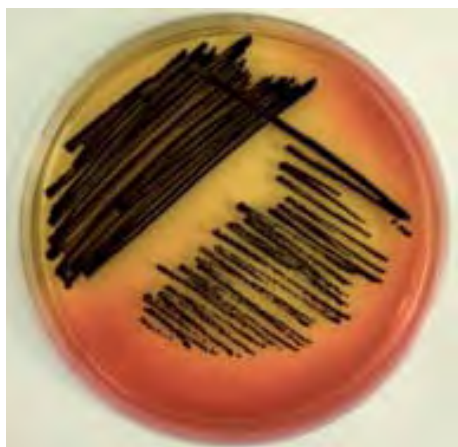


Рис. 8. Рост *S. aureus* Wood-46 на агаре Фогель Джонсона.

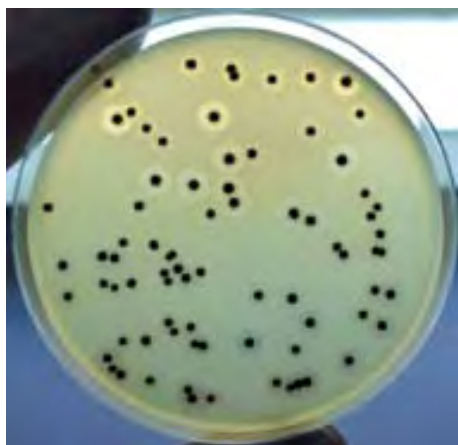


Рис. 9. Рост *S. aureus* на агаре Байрд-Паркера (ФБУН ГНЦ ПМБ).



Рис. 10. А – рост тест-штамма *S. aureus* «Виотко» на тиогликолевой среде (ФБУН ГНЦ ПМБ) через 24 ч инкубации; Б – рост тест-штамма *S. aureus* «Виотко» на тиогликолевой среде (ФБУН ГН Ц ПМБ) через 48 ч инкубации.

сред вошли и среды для выделения стафилококков. На рис. 7 представлен маннит-солевой агар, разлитый на модуле в чашки Петри, и результаты проведенного биологического контроля на примере посева тест-штамма *S. aureus* FDA 209-P (ATCC 6538-P).

В настоящее время ассортимент дифференциальных, элективных и накопительных сред, предложенных для выявления стафилококков, весьма значителен и продолжает расширяться.

Для выделения стафилококков из клинического материала используются высокоселективные питательные среды, в том числе агар Фогеля–Джонсона (Vogel-Johnson Agar Medium) [7]. Отечественная «Основа агара Фогеля–Джонсона» после внесения 2%-го раствора теллурита калия используется для проведения бактериологического исследования клинического материала, предположительно инфицированного стафилококками, с целью выделения возбудителя стафилококковой инфекции и идентификации его принадлежности к патогенным маннитположительным стафилококкам. Ферментирующие маннит стафилококки образуют на среде черные колонии (реакция восстановления теллурита до металлического теллура), окруженные желтой зоной (рис. 8), не ферментирующие маннит – черные колонии без пожелтения среды вокруг. Хлорид лития и теллурит калия подавляют рост большинства сопутствующих микроорганизмов.

Основа агара Байрд-Паркера с добавлением эмульсии яичного желтка и 2%-го раствора теллурита калия используется для приготовления питательной среды – Агара Байрд-Паркера [8, 9]. Среда предназначена для выделения и учета коагулазоположительных стафилококков в пищевых продуктах, фармацевтических и косметических продуктах, экологических пробах и других образцах, а также для проведения бактериологического исследования клинического материала, предположительно инфицированного стафилококками, с целью выделения возбудителя стафилококковой инфекции и идентификации его принадлежности к патогенным стафилококкам по признаку проявления лецитиназной активности.

Глицин и пируват натрия стимулируют рост стафилококков. Хлорид лития и теллурид калия подавляют рост большинства сопутствующих микроорганизмов, не влияя на рост стафилококков. После добавления желтка среда становится желтой и непрозрачной. Яичная эмульсия является субстратом, необходимым для определения лецитиназы. Стафилококки образуют колонии черного цвета в связи с восстановлением теллурида калия до теллура. Реакция с яичным желтком и восстановление теллурида протекают одновременно с действием коагулазы и поэтому могут служить ее показателем. Рост *S. aureus* на агаре Байрд-Паркера (ФБУН ГНЦ ПМБ) представлен на рис. 9.

После инкубации у выделенных штаммов проверяют морфологию, тинкториальные свойства (окраска по Граму) и наличие плазмокоагулирующей активности в реакции плазмокоагуляции (РПК) [4].

Одним из основных дифференциальных признаков стафилококков, имеющих медицинское значение, является способность к росту в анаэробных условиях – на тиогликолевой среде. Эта среда может применяться и для исследования материала, мало контактированного стафилококками.

В тиогликолевой среде при росте тест-штамма *S. aureus* наблюдается образование отдельных колоний (тяжей) через 24 ч инкубации и через 48 ч инкубации с прозрачной зоной в верхней части столбика [3] (рис. 10, А, Б).

На кровяном агаре большинство патогенных видов стафилококков образуют зону гемолиза вокруг колонии (β -гемолиз) (рис. 11).

Для выращивания стафилококков при контроле микробной загрязненности нестерильных лекарственных средств и других объектов, а также при проведении исследований в санитарной и клинической микробиологии используется питательная среда №8 ГРМ (рис. 12). Сбалансированный состав среды обеспечивает питательные потребности для характерного роста *S. aureus* в виде диффузного помутнения среды через 21 ± 3 ч при температуре культивирования $33 \pm 2^\circ\text{C}$. Питательная среда высокочувствительна и обеспечивает рост стафилококков при посеве из разведения 10^{-8} (рис. 12).

Показатель КМАФАнМ характеризует качество, свежесть и безопасность продуктов питания, а также позволяет оценивать уровень санитарно-гигиенических режимов на производстве, условий хранения и транспортировки продукта. Среда КМАФАнМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ предназначена для определения общей бактериаль-

ной обсемененности пищевых продуктов, фармацевтических и косметических продуктов, воды, объектов окружающей и производственной среды. При определении специфической активности среды рост тест-штаммов *S. aureus* ATCC 6538-Р обнаруживается в виде круглых, слегка выпуклых, с ровными краями колоний, диаметром 1,5–2,0 мм (рис. 13). На рис. 14 представлен рост стафилококков при посеве глубинным методом с использованием среды КМАФАнМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ.

С каждым годом проблема резистентности бактериальных возбудителей инфекции различной локализации становится все более значимой [10]. Такая ситуация делает необходимым использование этиотропного принципа назначения антибактериальной терапии. Этиотропное назначение антибиотиков предполагает не только выделение возбудителя инфекции из клинического материала, но и

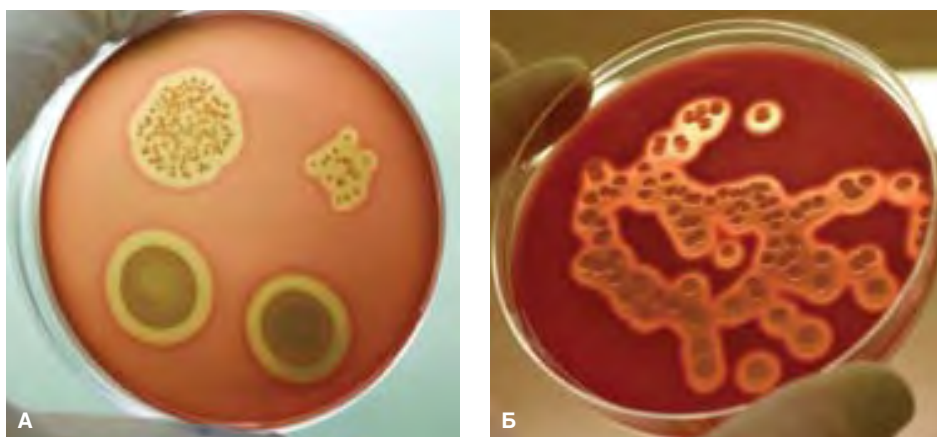


Рис. 11. А – наличие гемолитической активности при росте тест-штамма *S. aureus* FDA 209-Р (ATCC 6538-Р) на среде АГВ (ФБУН ГНЦ ПМБ) с добавлением крови; Б – наличие гемолитической активности при росте тест-штамма *S. aureus* 7776 на ГРМ-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ) с добавлением крови.

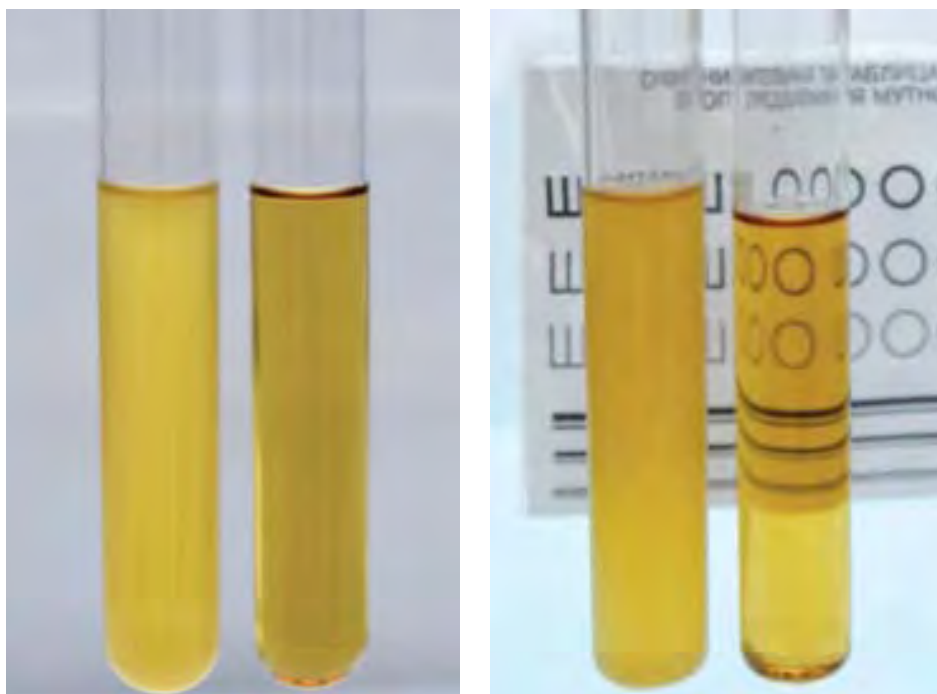


Рис. 12. *S. aureus* ATCC 6538-Р, рост на среде №8 ГРМ.



Рис. 13. Рост тест-штамма *S. aureus* FDA 209-Р на среде КМАФАнМ (ФБУН ГНЦ ПМБ).



Рис. 14. Рост стафилококков на среде КМАФАнМ (ФБУН ГНЦ ПМБ).



Рис. 15. Определение чувствительности штамма *S. aureus* 29213 к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона II (производство ФБУН ГНЦ ПМБ).

определение его чувствительности к антибактериальным препаратам. Для этих целей используются соответствующие питательные среды. Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (агар Мюллера–Хинтон II) производства ФБУН ГНЦ ПМБ предназначена для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) диско-диффузионным методом (ДДМ) с целью определения терапевтической схемы лечения инфекционных болезней и характеристики штаммов.

Широкое распространение заболеваний стафилококковой инфекцией связано в первую очередь с интенсивностью циркуляции стафилококков, значительной устойчивостью их во внешней среде и естественным отбором высоковирулентных, полирезистентных к антибактериальным препаратам штаммов. Для оценки чувствительности используют специально предназначенные для этой цели среды, разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном порядке. Для определения чувствительности ДДМ используют только стандартизированные качественные диски [11]. На рис. 15 представлены результаты определения чувствительности штамма *S. aureus* 29213 к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом.

Таким образом, ФБУН ГНЦ ПМБ производит полный набор питательных сред для диагностики стафилококковой инфекции, для накопления и изучения культуральных и морфологических признаков бактерий стафилококка, а также для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Использование вышеуказанных отечественных питательных сред позволит успешно решать задачи не только выявления стафилококковой инфекции, но и своевременного и эффективного назначения антибактериальной терапии, диагностики заболевания, выявления бактерионосителей среди работников детских, лечебных учреждений и пищевых объектов, выявления источника заболевания, установления факторов передачи инфекции (исследование пищевых продуктов, воздуха, зараженных предметов и других объектов).

Литература

1. Идентификация энтеробактерий и стафилококков. Информационные материалы. Нижний Новгород, 2007, с. 4. Доступно по: <http://www.npods.ru/>.
2. Клиническая лабораторная аналитика. Том IV. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. Под ред. В.В.Меньшикова. М.: Агат-Мед, 2003, 816 с.
3. Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Дятлов ИА. Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии. Биопрепараты. 2015;4:39-43.
4. Методические указания МУК 4.2.2942-11. Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях.
5. Кисленко ВН, Колычев НМ, Госманов РГ. Ветеринарная микробиология и иммунология. Под ред. проф. В.Н.Кисленко. 4-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012, с. 452.
6. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII.
7. Патент Питательная среда для селективного выявления патогенных маннит-положительных стафилококков. Доступно по: <http://www.findpatent.ru/patent/262/2620965.html>.
8. ГОСТ Р 54674-2011. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Метод выявления и определения *Staphylococcus aureus*.
9. ГОСТ 30347-2016. Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*.
10. Рудаков НВ. Краткий курс лекций по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. Часть 2. Частная микробиология и вирусология. Учебное пособие. Омск, 2003, 133 с.
11. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания.

References

1. Identification of Enterobacteriaceae and staphylococcus. Information material. Nizhniy Novgorod, 2007, pp. 4. Available at: <http://www.npods.ru/> (In Russian).
2. Klinicheskaya laboratornaya analitika. Vol. IV. Chastnye analiticheskie tekhnologii v klinicheskoi laboratorii. Edited by V.V.Men'shikov. Moscow: "Agat-Med" Publ., 2003, 816 p. (In Russian).
3. Shepelin AP, Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Dyatlov IA. Culture media for detection of staphylococci in clinical and sanitary micro-

- biology BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2015;4:39-43. (In Russian).
4. Methodical instructions of FLOURS 4.2.2942-11. Methods of sanitary and bacteriological studies of environmental objects, air and sterility control in medical organizations. (In Russian).
 5. Kislenco VN, Kolychev NM, Gosmanov RG. Veterinarnaya mikrobiologiya i immunologiya. Edited by V.N.Kislenco. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ., 2012, pp. 452. (In Russian).
 6. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII. (In Russian).
 7. Patent Nutrient medium for the selective identification of pathogenic staphylococci manipulatively. Available at: <http://www.findpatent.ru/patent/262/2620965.html> (In Russian).
 8. GOST R 54674-2011. Poultry, offal and semi-finished products from poultry. Method of detection and determination of *Staphylococcus aureus*. (In Russian).
 9. GOST 30347-2016. Milk and dairy products. Methods for determining *Staphylococcus aureus*. (In Russian).
 10. Rudakov NV. Kratkii kurs lektsii po meditsinskoj mikrobiologii, virusologii i immunologii. Chastnaya mikrobiologiya i virusologiya. Omsk, 2003, 133 p. (In Russian).
 11. MUK 4.2.1890-04. Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Methodical instructions. (In Russian).

Информация о соавторах:

Сергеева Анна Борисовна, инженер-микробиолог ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, г.п. Оболенск
ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0017
E-mail: Shadowwrite@mail.ru

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, заведующая сектором микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, г.п. Оболенск
ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0017
E-mail: polosenko@obolensk.org

Information about co-authors:

Anna B. Sergeeva, engineer-microbiologist, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0017
E-mail: Shadowwrite@mail.ru

Olga V. Polosenko, PhD (Biology), chief of microbiological research department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0017
E-mail: polosenko@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Основа агара Фогель–Джонсона сухая

С 2018 года ФБУН ГНЦ ПМБ начал выпуск питательной среды, предназначенной для проведения бактериологического исследования клинического материала, предположительно инфицированного стафилококками, с целью выделения возбудителя стафилококковой инфекции и идентификации его принадлежности к патогенным маннитположительным стафилококкам, сухой (Основа агара Фогель–Джонсона).

Основа агара Фогель–Джонсона с внесенным 2% раствором теллурита калия (в комплект поставки не входит) обеспечивает питательные потребности для селективного роста стафилококков, в том числе маннитположительных.

Хлорид лития и теллурид калия подавляют рост большинства сопутствующих микроорганизмов. Все стафилококки характеризуются наличием фермента – теллуридредуктазы, поэтому образуют колонии черного цвета в связи с восстановлением теллурита калия до теллура. Маннит служит дифференцирующим агентом. Способность стафилококков к ферментации маннита является важным показателем их патогенности.

Питательная среда зарегистрирована в качестве медицинского изделия и имеет регистрационное удостоверение №РЗН 2018/7191 от 23 мая 2018 года.





V Форум Университетской Науки «Научное медицинское прогнозирование: молекулярно-генетические аспекты, триггеры патогенеза, ятрогенные влияния»

15 мая 2018 года, в рамках V Форума Университетской Науки, на базе Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И.Евдокимова прошли три секционных заседания, имеющих отношение к проблемам современной микробиологии и эпидемиологии:

- Научно-практическая конференция и заседание учебно-методической комиссии ФУМО МЗ РФ, посвященные 75-летию кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ имени А.И.Евдокимова;
- Симпозиум «Бактериофаги в современной клинической медицине – “за” и “против”»;
- Научно-практическая конференция «Избранные вопросы инфекционных болезней».

Все мероприятия были аккредитованы по системе НМО Министерством образования и науки РФ.

На конференции и заседании учебно-методической комиссии ФУМО МЗ РФ, посвященных 75-летию кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ имени А.И.Евдокимова (*Председатели: профессор Царёв В.Н., профессор Алёшкин А.В.*), прозвучали доклады:

В.Н.Царёв

История кафедры микробиологии в зеркале современных научных достижений.

Е.В.Ипполитов

Микробные биопленки и проблемы стоматологии.

Учебно-методическая комиссия по микробиологии, вирусологии, иммунологии ФУМО Министерства здравоохранения РФ с участием заведующих кафедрами России одобрила новый профессиональный стандарт «Специалист в области микробиологии», разработанный рабочей группой и представленный на утверждение в Министерство здравоохранения РФ и Министерство высшего образования РФ, обсудила Проект примерной рабочей программы высшего образования по микробиологии, вирусологии, иммунологии и оснащение вузов учебной литературой, а также мероприятия по подготовке 12–13 сентября 2018 г. IV Национального конгресса бактериологов с международным симпозиумом «Микроорганизмы и биосфера «MICROBIOS-2018» в г. Омске.

В работе заседания приняли участие: академик РАН, профессор И.А.Дятлов (Оболensk), профессора В.А.Алёшкин, В.Н.Царёв, А.В.Алёшкин (Москва), И.А.Базиков (Ставрополь), А.Н.Евстропов (Новосибирск), А.В.Куяров (Сургут), А.Ю.Миронов (Москва), Н.В.Рудаков (Омск), Л.Я.Плахтий (Владикавказ), В.М.Червинец (Тверь), В.О.Пожарская (Ставрополь) и другие.

На симпозиуме «Бактериофаги в современной клинической медицине – “за” и “против”» (*Председатели: профессор Царёв В.Н., профессор Алёшкин А.В.*) были представлены следующие доклады.

А.В.Алёшкин

Инновационные направления применения бактериофагов: от фагопрофилактики к высокотехнологичной медицинской помощи на основе фаготерапии.

Н.В.Воложанцев

Литические бактериофаги Klebsiella pneumoniae и их полисахарид-деградирующие ферменты.

Е.О.Рубальский, В.Н.Царёв

Фаготерапия в клинике сердечно-сосудистой, торакальной и трансплантационной хирургии.

В.И.Чувилкин, Е.В.Ипполитов

Обоснование применения препаратов на основе бактериофагов и лактоферрина для профилактики и лечения воспалительных процессов в хирургической стоматологии.

Г.С.Пашкова

Применение фаготерапии в пародонтологии.

К.И.Нестерова

Современные виды фаготерапии при патологии ЛОР-органов.

А.В.Летаров

Стратегии инфицирования клеток у бактериофагов: возможны ли фаги широкого спектра?

С.С.Бочкарева, Е.О.Рубальский

Иммунологические аспекты фаготерапии.

М.Н.Анурова

Перспективы разработки современных лекарственных форм с бактериофагами.

На секции «Избранные вопросы инфекционных болезней» (Председатели: академик РАН, профессор Н.Д.Ющук, профессор Е.А.Климова) были заслушаны следующие доклады.

Н.Д.Ющук, Е.А.Климова

ВГВ-инфекция – новый взгляд на привычный исход болезни.

Г.Н.Кареткина

Листериоз – сто лет изучения.

О.О.Знойко, П.А.Белый

Социально-экономические предпосылки «раннего» лечения хронического гепатита С.

Н.Х.Сафиуллина, О.О.Знойко, И.П.Балмасова, Н.Д.Ющук

Фиброэластометрия печени с функцией CAP™ – роль в диагностике, прогнозе и тактике ведения больного хроническим гепатитом С.

П.А.Белый, Т.Н.Маркова, О.О.Знойко

Диабет 2 типа и хронический гепатит С – клинко-патогенетические параллели.

С.А.Михнева, Ю.В.Мартынов

Эпидемиологические особенности и клинический полиморфизм инфекционного мононуклеоза.

О.В.Добронравова, С.Л.Максимов

Диагностика туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией с помощью LAM- теста.

П.Г.Филиппов, О.Л.Тимченко, О.Л.Огиенко, Д.А.Рево

Острая ВИЧ-инфекция: особенности течения и диагностики на современном этапе.

Форум Университетской науки успешно завершил свою работу традиционной конференцией «**День молодежной науки МГМСУ**» 19 мая 2018 г. под председательством ректора МГМСУ, члена-корреспондента РАН, профессора О.О.Янушевича и проректора по науке Е.А.Вольской.

Исторический очерк к 75-летию кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И.Евдокимова

Анализируя биографии ученых-бактериологов начала XX века, удивляешься, насколько многообразны были взаимодействия разных учреждений и разных, тогда еще только формирующихся научных школ. Ярким примером этого явилась личность профессора **Петра Фёдоровича Беликова** (1892–1961 гг.), который начал работать в Государственном институте стоматологии и одонтологии (ГИСО) с 1923 г. С его именем связано создание химико-бактериологической лаборатории в 1923 г., а затем – выделение кафедры микробиологии как структурной единицы ГИСО в 1943 г. Хотя преподавание микробиологии как самостоятельной дисциплины для студентов в ГИСО начал профессор **М.Л.Капусто** в начале 40-х годов.

П.Ф.Беликов родился в Москве 23 июня 1892 г., в районе, исторически связанном с нашим университетом, – семья жила в д. 33 (ныне Долгоруковская ул.), а затем – на Пименовской, д. 38 (ныне Краснопролетарская ул.). В 1914–16 гг. служил в царской армии, затем закончил Медицинский университет, был принят бактериологом в Институт им. Г.Н.Габричевского и на должность ассистента кафедры микробиологии Первого Медицинского университета, которая тогда базировалась в прозектуре Ново-Екатерининской больницы у Петровских ворот. Далее одновременно работал санитарным врачом Московской городской управы по Суцёвскому, Мариинскому и Крестовскому районам до 1923 г., когда был приглашен на работу в ГИСО.

Уже в 1927 г. на итоговой научной сессии ГИСО прозвучали доклады П.Ф.Беликова и его сотрудников – В.Ф.Гроссе, О.Г.Кюзель, Е.М.Приказчиковой, Б.И.Мигунова, в которых были заложены физико-химические, биохимические и микробиологические подходы к изучению кариеса зубов и пародонтоза. Пётр Фёдорович значительную часть своей деятельности посвятил стоматологии, принимал активное участие в издании журнала «Одонтология и стоматология». Длительный период времени проф. П.Ф.Беликов работал вместе с ректором ММСИ А.И.Евдокимовым, занимая должность проректора по учебно-научной работе. П.Ф.Беликову принадлежит свыше 60 работ, третья часть которых посвящена микробиологии полости рта.

В этот период времени П.Ф.Беликов также являлся зам. директора по науке Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, где он активно работал над решением проблем детских инфекций – дифтерии, кори, скарлатины, паротита, детских пневмоний, гриппа, полиомиелита. В 1930 г. он был арестован по делу врачей-микробиологов вместе с другими сотрудниками НИИВС им. И.И.Мечникова и в 1931 г. сослан в Казахстан. Находясь в ссылке, вместе с микробиологами из Ленинграда,





Лидия Николаевна Ребреева



Владимир Иванович Сачков



Иван Иванович Олейник

Сталинграда и других городов России организовали кафедру микробиологии Казахского медицинского института. Работали над производством осповакцины и дифтерийного анатоксина. После возвращения из ссылки, в 1934 г., П.Ф.Беликов организовал лабораторию клинической микробиологии в МОНИКИ им. Владимирского.

С 1943 г. по 1961 г. П.Ф.Беликов – заведующий кафедрой микробиологии Московского стоматологического института (МСИ), а в 1947 г. он принимает приглашение ректора Г.Н.Белецкого занять должность проректора по научно-учебной работе, которым является до 1955 г. До конца своих дней ведет активную педагогическую и общественную работу. Являясь членом Ученого Совета Министерства здравоохранения России и Правления общества микробиологов, профессор П.Ф.Беликов внес значительный вклад в организацию здравоохранения и микробиологической лабораторной службы в стране и фактически создал бактериологическую службу в отечественной стоматологии.

Доктор медицинских наук **Лидия Николаевна Ребреева** (род. 1907) исполняла обязанности заведующей кафедрой микробиологии с 1961 г. по 1964 г. Выпускница Ленинградского медицинского института, в 30-е годы по распределению работала врачом в Казахстане. По возвращению защитила кандидатскую диссертацию и в 1939 г. была принята на работу ассистентом кафедры микробиологии МСИ.

В годы Великой Отечественной войны работала бактериологом Военно-Полевого госпиталя, а затем вернулась на кафедру. Имеет правительственные награды. Работала ассистентом, затем – доцентом кафедры. В трудный для коллектива период, в начале 60-х, исполняла обязанности заведующей кафедрой микробиологии МСИ. Под ее руководством проводились интереснейшие исследования в области микрофлоры полости рта, развивались концепции микробной этиологии кариеса зубов, одонтогенной инфекции, дисбактериоза и другие актуальные вопросы стоматологии.

В одном из древних манускриптов сказано: «Если хочешь получить совет, какой образ жизни тебе подходит, надо об-

ращаться к врачу не только опытному, но и ученому, проницательному и мыслящему, ибо прописать несколько рецептов легче, чем определить правило жизни для каждого». Л.Н.Ребреева была человеком именно такого плана. Являясь не только выдающимся ученым, но и замечательным педагогом, Л.Н.Ребреева определила судьбы своих учеников и закрепила приоритет кафедры МСИ в области разработки проблем микробиологии полости рта в СССР.

Под руководством Лидии Николаевны в 1962 г. было издано первое и единственное тогда в стране пособие по «Микробиологии полости рта для студентов стоматологических факультетов». Классические научные исследования Л.Н.Ребреевой, ее докторская диссертация определили новое научное направление в России – анаэробную микробиологию полости рта. Л.Н.Ребреева написала главу «Микробиология полости рта» в Руководстве по стоматологии под ред. чл.-корр. АМН СССР А.И.Евдокимова – основателя советской системы стоматологической службы. В 1968 г. Л.Н.Ребреева защитила диссертацию доктора медицинских наук по микробиологии одонтогенной инфекции. После ухода из МСИ длительное время работала в бактериологической лаборатории ЦНИИС.

Доктор медицинских наук, профессор **Владимир Иванович Сачков** (1924–1977 гг.) являлся заведующим кафедрой микробиологии Московского медицинского стоматологического института им. Н.А.Семашко (ММСИ), как стал тогда называться вуз, с 1965 по 1973 гг. В.И.Сачков родился в Ростове-на-Дону. В 1943 г. – курсант Гурьевского пехотного училища средних командиров. В действующей армии был до мая 1943 г., когда демобилизовался в связи с тяжелым ранением. В 1944 г. поступил в Астраханский медицинский институт, затем переехал в г. Москву, где окончил Московский медицинский институт (1945 г.). Закончил аспирантуру Института экспериментальной патологии и терапии рака АМН СССР, защитил кандидатскую диссертацию «К иммунологии метастазирования». До 1965 г. работал старшим научным сотрудником Института ревматизма АМН СССР. В 1962 г. защитил докторскую диссертацию «Иммуно-

логические методы изучения ревматизма и других коллагеновых болезней».

С 1965 г. под руководством Владимира Ивановича происходит расширение штатного состава сотрудников кафедры микробиологии ММСИ им. Н.А.Семашко, впервые появляются аспиранты. Количество преподавателей с 3 человек (1963 г.) возрастает до 11 (1972 г.). Под руководством В.И.Сачкова были успешно защищены две кандидатские и одна докторская диссертации. На кафедре силами сотрудников был создан большой фонд диапозитивов и других демонстрационных материалов для студентов. Основное направление научной работы кафедры в тот период – изучение роли микрофлоры в полости рта, особенно стрептококков и стафилококков. За этот период сотрудниками кафедры было опубликовано более 70 научных работ.

Широкую известность получила монография В.И.Сачкова «Антигенные свойства сывороточных белков при некоторых коллагеновых болезнях» (1969 г.). На кафедре начал активную работу научный студенческий кружок, члены которого выступали на общеинститутских и на Всероссийских конференциях. Одна из учениц В.И.Сачкова – А.Г.Пономарёва в настоящее время является доктором мед. наук, профессором. Проводит исследования в области патогенеза гемо- и эндотоксикозов, спортивной медицины и восстановительной медицины, фитотерапии. В.И.Сачковым подготовлено 2 доктора и 40 кандидатов медицинских наук. После ухода из ММСИ им. Н.А.Семашко заведовал лабораторией функциональных методов исследования Института питания АМН СССР.

Доктор медицинских наук, профессор **Иван Иванович Олейник** (1932–1991 гг.) – выпускник, а затем преподаватель Военно-медицинской Академии им. С.М.Кирова в г. Ленинграде. С 1973 по 1991 гг. И.И.Олейник возглавлял кафедру микробиологии Московского медицинского стоматологического института им. Н.А.Семашко.

Обладая кипучей энергией, Иван Иванович проявил себя не только как выдающийся ученый-педагог, замечательный лектор, но и как прекрасный организатор. Длительное время он являлся главным редактором многотиражной газеты ММСИ, был членом ряда Ученых Советов по микробиологии и иммунологии (при 1 ММИ, НИИВС и ММСИ), членом редакционной коллегии центрального журнала «Стоматология». Под его руководством значительно улучшилась материальная база кафедры, установлена селекторная связь, были внедрены современные методы иммунолюминесцентной микроскопии и иммуноферментного анализа.

С 1983 г. кафедра микробиологии, как режимное в санитарном плане учреждение, расположена в отдельном корпусе. С 1973 по 1992 гг. под руководством И.И.Олейника было опубликовано 5 монографий и более 100 научных работ. Под руководством И.И.Олейника выполнено 4 докторских и более 20 кандидатских диссертаций. Приоритетным направлением кафедры было определено изучение микробиологии и иммунологии ротовой полости. Под его руководством проведена одна из первых отечественных работ по расшифровке антигенной структуры кариесогенного вида стрептококков – *Streptococcus mutans* и были получены моноклональные сыворотки для идентификации сероваров (Давыдова М.М., Покровский В.Н., Спиранде И.В., Тарадайко И.В.).

Известны также исследования И.И.Олейника и его учеников в области пульмонологии, стафилококковой инфекции и клинической иммунологии (Пономарёва А.Г., Царёв В.Н.). В 1990 г. вышла в свет ключевая монография по вопросам биологии ротовой полости под редакцией Е.В.Боровского и В.А.Леонтьева, в которой главу по микробиологии полости рта в норме и при патологических состояниях зубо-челюстной системы написал И.И.Олейник. Это было первое отечественное издание такого рода. В 2001 г. монография «Биология полости рта» была переиздана.

Под руководством И.И.Олейника сложился современный коллектив кафедры микробиологии МГМСУ, включающий опытных педагогов и ученых – профессоров Е.А.Кузнецова, В.Н.Покровского, М.М.Давыдову, В.Н.Царёва, доцентов Ф.Ф.Волченко, С.И.Тихонову, О.А.Гусеву, Т.И.Графову, А.С.Самойленко, И.В.Спиранде, И.В.Тарадайко, Т.Г.Ширко, В.И.Чувилкина, А.С.Носика. Ученики Ивана Ивановича – О.Г.Крамарь, Т.Г.Козлова, В.Г.Жуховицкий, В.Г.Мельников и многие другие работают сегодня в разных университетах, научно-исследовательских институтах и бактериологических лабораториях страны.

Заведующий кафедрой микробиологии ММСИ им. Н.А.Семашко, а затем МГМСУ с 1992 по 2002 г. – доктор медицинских наук, профессор **Евгений Алексеевич Кузнецов** (род. 1932 г.) – выпускник Военно-морской медицинской Академии в г. Ленинграде. После окончания академии служил в ограниченном контингенте советских войск на Кубе.

После возвращения в Москву работал научным сотрудником в НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи. С 1970 г. – старший преподаватель, а затем доцент кафедры микробиологии (1976 г.) ММСИ им. Н.А.Семашко. Защитил докторскую диссертацию по иммунологии коклюша. Имеет более 100 опубликованных печатных работ, включая известную статью в иностранной печати о проблемных аспектах в перспективных направлениях лечения СПИДа «Two creasy ideas about the treatment of AIDS». Энергичный руководитель и неординарный ученый, под руководством которого защищено 5 кандидатских и одна докторская диссертация. Специалист в области иммунологии коклюша, принимавший участие в создании убитой коклюшной вакцины.

Евгений Алексеевич большое внимание уделял педагогической и учебно-методической работе со студентами. Автор многочисленных учебных пособий (свыше 20) для студентов по микробиологии, вирусологии и иммунологии, Е.А.Кузнецов поднял на новый качественный уровень учебно-методическую работу на кафедре, впервые применил компьютерные технологии визуализированного тестового контроля при оценке знаний студентов. К новаторским печатным работам следует отнести трилогию учебных пособий, вышедших в 1996–2001 гг.: «Введение в микробиологию», «Введение в инфекционную иммунологию», «Введение в вирусологию», а также «Симбиоз с микробами» и «Микробная флора полости рта в норме и при патологических процессах челюстно-лицевой области» (1996 г.).

Заслуженный работник высшей школы России, доктор медицинских наук, профессор **Виктор Николаевич Царёв** (род. 1955 г.) – выпускник лечебного факультета ММСИ им. Н.А.Семашко в 1978 г. Закончил аспирантуру на кафед-

ре под руководством И.И.Олейника и в 1981 г. защитил кандидатскую диссертацию по применению ультразвуковых ингаляций лизоцима при лечении хронической пневмонии. Еще будучи студентом, принимал активное участие в строительстве стоматологического комплекса университета, а с 1983 по 1986 гг. являлся секретарем комитета ВЛКСМ ММСИ им. Н.А.Семашко, проводил мероприятия Олимпиады-80 и Фестиваля молодежи и студентов в г. Москве (1985 г.), неоднократно выезжал со студентами на сельскохозяйственные работы. Работая на кафедре, В.Н.Царёв вел педагогическую работу и активно осваивал новые методы бактериологической и иммунологической диагностики. В 1992 г. защитил докторскую диссертацию по двум специальностям – иммунологии и стоматологии, в 1993 г. стал профессором кафедры (диплом профессора ВАК по микробиологии, вирусологии, иммунологии).

С конца 2002 г. В.Н.Царёв возглавляет кафедру микробиологии и одновременно (с 2004 г.) является директором Научно-исследовательского медицинского стоматологического института (НИМСИ) при МГМСУ. При активном участии Виктора Николаевича кафедра официально получила название «кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии». В.Н.Царёв и возглавляемые им коллективы (кафедра и лаборатории НИМСИ) одними из первых в стране начали разрабатывать и внедрять в медицинскую практику методы молекулярной диагностики в области анаэробной микробиологии, изучать применение в стоматологии антибиотиков с противоанаэробной активностью и иммуномодулирующими свойствами, механизмы формирования биопленки на различных объектах в полости рта (зубы, слизистая оболочка, пломбы, имплантаты, протезы и ортодонтические конструкции). Это позволило научно обосновать критерии для выбора различных стоматологических материалов

с целью реставрации зубов и протезирования для практических врачей.

В мае 2005 г. кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ переведена на новую базу по адресу: ул. Онежская, д. 7. На новой базе удалось существенно увеличить площади для проведения учебного процесса со студентами, а также

для научной работы. Спланировано размещение двух лабораторий НИИ – лаборатории молекулярно-биологических исследований и лаборатории иммунологии. Благодаря этому стало возможным создать современные условия для проведения ПЦР-диагностики (комплекс из лаборатории и трех боксов, а также помещения для проведения электрофореза на другом этаже), автоматизированного культивирования микроорганизмов, иммунологических исследований, анаэробную бактериологическую лабораторию, повысить эффективность работы автоклавной и стерилизационной.

Под руководством В.Н.Царёва защищено 11 докторских и более 100 кандидатских диссертаций, проводятся современные исследования по микробиологии и иммунологии



Виктор Николаевич Царёв



полости рта, в том числе по состоянию микрофлоры полости рта у космонавтов во время длительных орбитальных полетов (в рамках российско-американских космических программ «Мир», «Альфа», «Марс-500»). В.Н.Царёв – член Международного общества по инфекционным болезням и антибактериальной терапии (ISID). Автор 460 печатных работ, 7 монографий, в том числе «Антибиотики и противоинфекционный иммунитет» под редакцией Н.Д.Ющука, И.П.Балмасовой, В.Н.Царёва, 12 патентов и нескольких медицинских технологий, свыше 40 методических рекомендаций и учебных пособий, 2 учебников по микробиологии, вирусологии, иммунологии, известного руководства для студентов «Практикум лабораторных занятий с иллюстрированными ситуационными заданиями по микробиологии, иммунологии и вирусологии» (совместно с академиком РАМН, проф. А.А.Воробьёвым, 2008 г.), учебников «Микробиология, вирусология и иммунология» для студентов стоматологических факультетов (2009 г.), «Микробиология, вирусология, иммунология полости рта» (2013 г.), разделов в руководстве «Медицинская микробиология» (2013, 2014) под редакцией А.С.Лабинской и Н.Н.Костюковой, национального руководства по пародонтологии (2018) и «Федерального регистра лекарственных средств. Стоматология» (2018).

Кафедра плодотворно взаимодействует с ведущими микробиологическими научными центрами страны – ГНЦ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, ГНЦ Медико-биологических проблем, Московским НИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологий и др.

В настоящее время на кафедре ведется активная научно-исследовательская и педагогическая деятельность, вводятся новые методы обучения и контроля знаний студентов, работает научный студенческий кружок. Внедряется в педагогический процесс микроскопия с цифровой фото и видеорегистрацией, разрабатываются методы интерактивной педагогики. Приоритетными являются разработки сотрудников кафедры по созданию новых лекарственных форм для лечения одонтогенной инфекции, заболеваний пародонта и осложнений имплантации зубов (патенты РФ на растворимые формы производных имидазола, использование новых антибиотиков и антисептиков), разработаны методики генодиагностики пародонтита и определения антибиотикорезистентности анаэробных штаммов бактерий (набор для ПЦР «МультиДент-5»), моделированию биопленок анаэробных бактерий и методик их разрушения, которые также запатентованы.

В.Н.Царёв, Е.В.Ипполитов

О создании Ассоциации «Национальное научно-практическое общество бактериологов»

10 апреля 2018 года Министерством юстиции Российской Федерации зарегистрирована некоммерческая организация Ассоциация «Национальное научно-практическое общество бактериологов» (Association «National scientific-practical society of bacteriologists»).

Основной целью деятельности Ассоциации является объединение юридических и физических лиц, заинтересованных в развитии и совершенствовании бактериологических исследований, направленных на улучшение диагностики инфекционных болезней в сфере здравоохранения, ветеринарии, пищевой промышленности, а также представление и защита общих интересов членов Ассоциации.

Ассоциация имеет достаточно большой спектр видов деятельности: разработка и реализация различных программ и проектов, направленных на изучение, обобщение и распространение передового отечественного и зарубежного опыта в сфере бактериологических исследований; участие, организация и проведение научных съездов, конгрессов, конференций, симпозиумов, семинаров, выставок с целью популяризации достижений науки и практики в области классических методов бактериологических исследований и внедрения их в практику здравоохранения; содействие членам Ассоциации в осуществлении функций, обеспечивающих достижение управленческих, социальных, научно-практических целей, а также представление законных интересов, содействие защите профессиональных, авторских и смежных прав членов Ассоциации; организация информационного обмена между членами Ассоциации; участие в разработке и дальнейшем внедрении современных методов микробиологической диагностики (культуральных и серологических методов исследований, методов молекулярной микробиологии); координация и объединение усилий научных и практических учреждений и их специалистов, направленных на совершенствование методов выявления возбудителей инфекционных заболеваний; содействие проведению научных исследований в области бактериологии и антибиотикорезистентности инфекционных патогенов; осуществление профессиональных и научных связей со специалистами и обществами других медицинских, биологических и ветеринарных специальностей, развитие международных научных связей; содействие научной, исследовательской, издательской, пропагандистской деятельности среди широкой медицинской, биологической и ветеринарной общественности; участие в разработке научно-обоснованной системы подготовки специалистов по профилю Ассоциации; участие в разработке и экспертизе программ и планов до- и последипломной подготовки специалистов; содействие в разработке, реализации и развитии эффективной защиты интересов производителей и поставщиков медицинских изделий,

являющихся членами Ассоциации; участие в порядке, предусмотренном действующим законодательством, в выработке решений органов государственной власти, местного самоуправления в разработке и в реализации программ, связанных с уставной деятельностью Ассоциации; учреждение средств массовой информации, организация просветительской, информационной, экспертно-консультационной деятельности по вопросам уставной деятельности Ассоциации; осуществление издательской деятельности в установленном законодательством порядке, включая выпуск и реализацию информационной литературы, периодических и научно-методических изданий, видеоматериалов, другой продукции по вопросам уставной деятельности Ассоциации и другие.

Учредителями Ассоциации являются ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора» и ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора.

Президентом Ассоциации избран д.м.н., профессор, академик РАН Дятлов Иван Алексеевич, вице-президентом – д.м.н., профессор Ефимов Евгений Игоревич, исполнительным директором – д.б.н. Шепелин Анатолий Прокопьевич.

Таким образом, в сфере научных и прикладных бактериологических исследований, направленных на совершенствование культурального метода выделения и идентификации живых бактериальных культур, создание коллекций бактериальных патогенов, разработку новых высокоэффективных селективных и селективных питательных сред, внедрение экспресс-тестов выявления патогенов, распространение методов гено- и иммунодетекции, подготовку кадров создана триада, призванная решать накопившиеся в данной отрасли проблемы, а именно – Ассоциация «Национальное научно-практическое общество бактериологов», Научно-практический журнал «Бактериология», Ежегодный «Национальный конгресс бактериологов».



Правила оформления статей (основные положения)

Журнал «Бактериология» публикуется на русском языке (резюме статей и ключевые слова – на русском и английском языках), распространяется на бумажном носителе и публикуется в электронной форме.

К публикации принимаются экспериментальные и обзорные статьи, а также короткие сообщения по прикладным и фундаментальным вопросам медицинской, ветеринарной и сельскохозяйственной бактериологии. Статьи принимаются без ограничения объема от граждан любой страны на русском языке. По согласованию с редакцией допускается публикация рекламных материалов, соответствующих тематике журнала.

Публикации, созданные в порядке выполнения служебного задания, должны иметь направление от учреждения, в котором выполнена работа. В направлении следует указать, что представленный материал ранее не был нигде опубликован и не находится на рассмотрении для публикации в других изданиях (включая зарубежные).

К публикации прилагается экспертное заключение организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов.

Материалы для публикации, включая сопровождающие документы, направляются в редакцию в электронной форме по адресу: info@obolensk.org или bacteriology@obolensk.org. В теме сообщения следует указать «Бактериология».

Требования к оформлению статьи.

Экспериментальная статья должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторах на русском и английском языках с указанием адреса, контактных телефонов (служебного и мобильного), факса и электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

Текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок – отдельным файлом.

РЕЗЮМЕ статьи должно быть представлено на русском и английском языках, отражать основные полученные результаты и содержать не более 250 слов.

КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (словосочетаний) должно быть не более 10, на русском и английском языках.

Во ВВЕДЕНИИ (без заголовка) следует изложить мотивацию написания данной работы и отдельным абзацем обозначить цель исследования. Дополнительно на английском языке.

Раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ должен содержать сведения об объекте исследования (включая источник получения, название коллекции) и краткое описание использованных методик, позволяющее их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала в кавычках и страны в скобках.

Следует использовать общепринятые современные сокращения мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. Единицы измерения должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная). Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов следует приводить в соответствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используют строчные буквы (курсив).

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

Сведения о финансовой поддержке работы приводятся в конце текста статьи перед списком литературы.

В СПИСКЕ ЛИТЕРАТУРЫ указываются авторы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для названия журналов используются общепринятые сокращения (<http://www.nlm.nih.gov/>).

В случае невыполнения настоящих правил оформления статья не принимается и отсылается авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:

142279, Московская обл.,

Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ

Тел. (4967) 36-00-46

Факс (4967) 36-00-10

E-mail: info@obolensk.org

или

bacteriology@obolensk.org