

Федеральная служба по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия человека

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ  
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ**

**Современное состояние и тенденции  
развития клинической и санитарной  
микробиологии. Инновационные технологии.  
Вопросы импортозамещения.**

**И.А. Дятлов**



# СИСТЕМАЯ БИОЛОГИЯ И ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Задачами системной биологии являются исследование и моделирование свойств сложных биологических систем, которые нельзя объяснить суммой свойств ее составляющих.

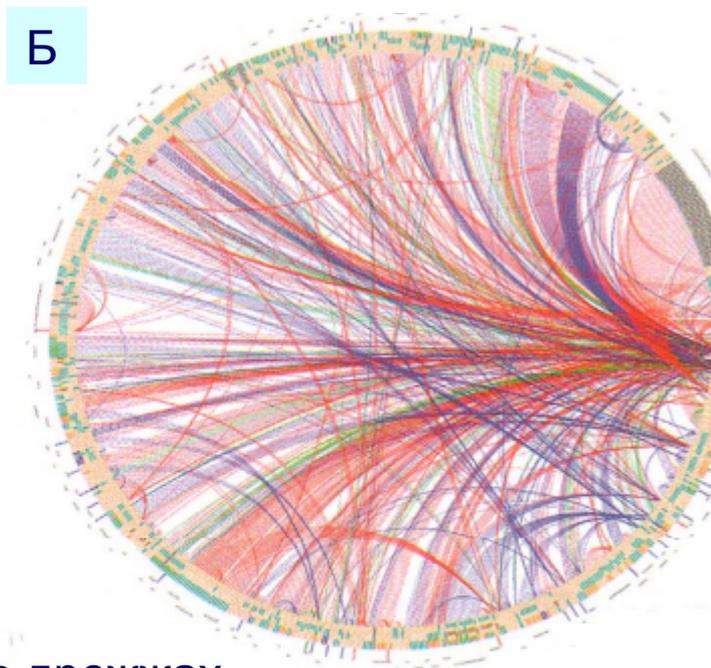
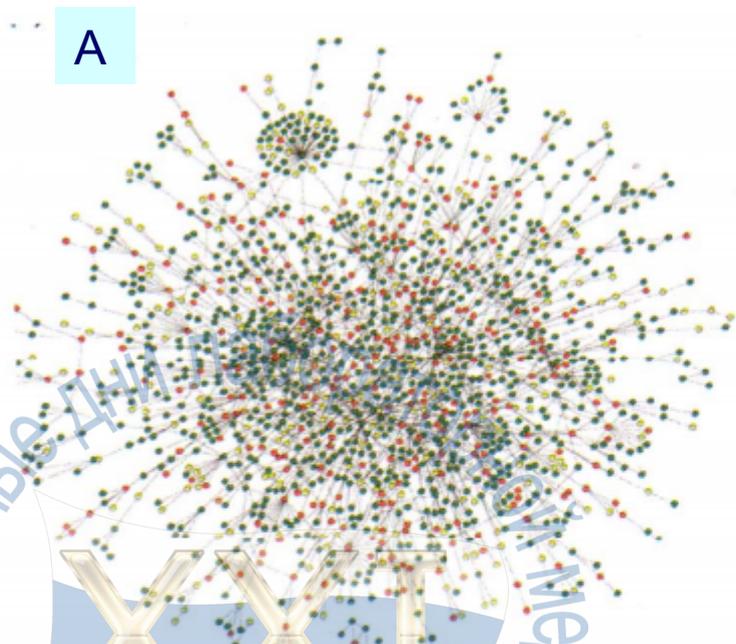
Новый и интегративный инструмент для выбора стратегий диагностики, профилактики и лечения.



# Принципы и инструменты системной биологии

Биологические сети моделируют цепь реакций, протекающие в клетке, ткани или органе, используя большие объемы вычислений.

Системная биология основана на принципе холизма, который гласит, что целое всегда есть нечто большее, чем простая сумма его частей, в отличие от редукционизма

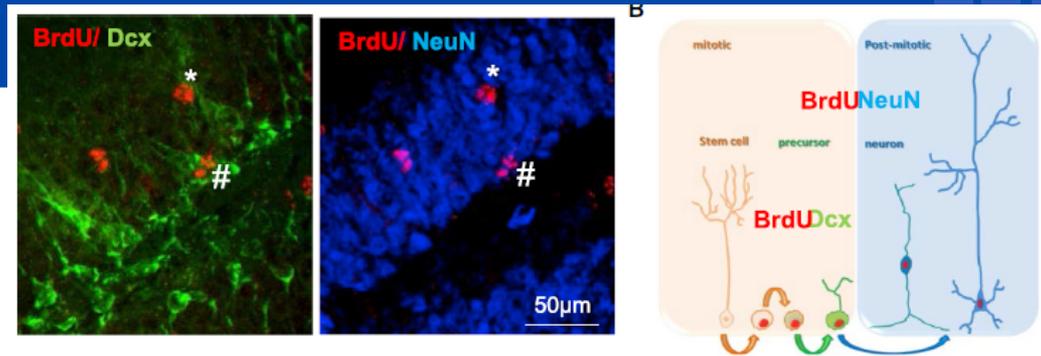
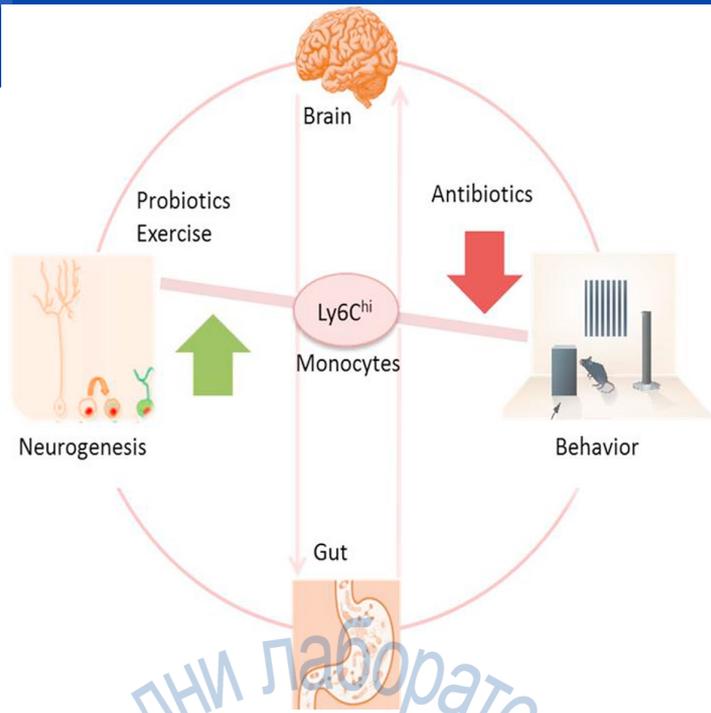


А. Белок-белковые взаимодействия в дрожжах.

Б. Регуляторные взаимодействия между генами в E.coli: красный – ингибированные, голубой – активированные, зеленые – с двойной регуляцией.

System biologi. A Texbook. Klipp et al.

# Влияние бактерий кишечника на память



Длительный курс антибиотиков уничтожает кишечные бактерии, замедляет рождение новых клеток мозга и приводит к нарушению памяти. Бактерии кишечника оказывают влияние на развитие центральной нервной системы через клетки иммунной системы - Ly6Ch<sup>hi</sup> моноциты.

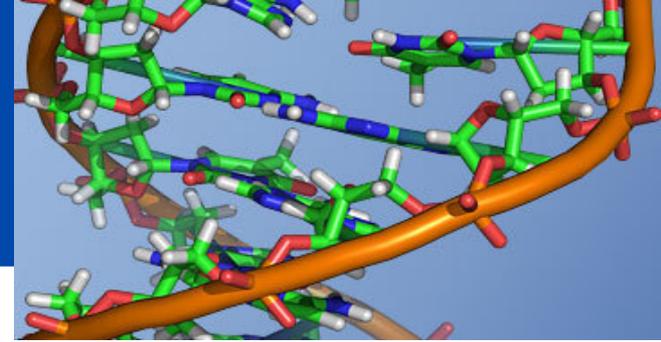
Введение Ly6Ch<sup>hi</sup> или даже пробиотиков улучшают память могут купировать негативное влияние АБ

## Ly6C<sup>hi</sup> Monocytes Provide a Link between Antibiotic-Induced Changes in Gut Microbiota and Adult Hippocampal Neurogenesis

Luisa Möhle,<sup>1,7</sup> Daniele Mattei,<sup>2,7</sup> Markus M. Heimesaat,<sup>3,7</sup> Stefan Bereswill,<sup>3</sup> André Fischer,<sup>3</sup> Marie Alutis,<sup>3</sup> Timothy French,<sup>1</sup> Dolores Hambardzumyan,<sup>4,5</sup> Polly Matzinger,<sup>6</sup> Ildiko R. Dunay,<sup>1,8</sup> and Susanne A. Wolf<sup>2,8,\*</sup>

\*Correspondence: [susanne.wolf@mdc-berlin.de](mailto:susanne.wolf@mdc-berlin.de)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.074>

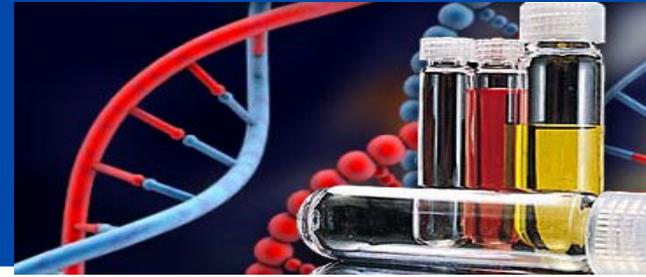
# Тенденции развития медицинской микробиологии



## ❖ **Лекарственная устойчивость.**

- Резистом – совокупность генов, влияющих на возникновение, эволюцию и способы проявления устойчивости – прогены (могут эволюционировать в гены устойчивости), молчащие гены – пробуждаются при мутациях или внешних факторах.
- Немутационная устойчивость – уменьшение синтеза поринов, активное выделение АБ из клетки и др.
- Биопленки – изучение синтеза внеклеточного полимерного матрикса, блокирование основных систем синтеза – компонентов QS и c-di-GMP (дигуанозинмонофосфата), полисахариды других видов микробов.
- Гетерогенность популяций бактерий – специализация клональных групп в условиях давления АБ. Популяционная микробиология.
- Роль персистеров в резистентности, низкий уровень АТФ, альтернативы.
- ❖ Исследование связи «микробиом – патоген-хозяин» при инфекциях с использованием “Meta-omics”-анализа.
- Исследование адгезии патогенов, колонизации и конкуренции.
- Синтетическая микробиология - базы синтеза отдельных компонентов клетки, выявление ключевых генов

# Тенденции развития медицинской микробиологии



- ❖ Построения филогенетической классификации на основании исследования генома, в т.ч. Некультивируемых клеток, культивируется только 15% бактерий, остальные «темная материя»
- ❖ Создание новых пробиотических штаммов и коктейлей
- ❖ Исследование CRISPR/Cas системы у бактерий, адаптивного иммунитета, использование для тонкого редактирования генома прокариот, в последнее время и эукариот
- ❖ Создание новых геноинженерных вакцинных штаммов бактерий с пониженной реактогенностью и усиленной протективностью
- ❖ Поиск новых антибиотиков, создание их модификаций и комбинаций
- ❖ Системная микробиология. Изучение биологической вариативности и взаимодействия микробов в мировом масштабе когда исследуются экосистемы от содержимого кишечника до океана метагеномным анализом. Всего до 1 млрд генов.

# Развитие культуральных методов

Отбор и подготовка **проб**

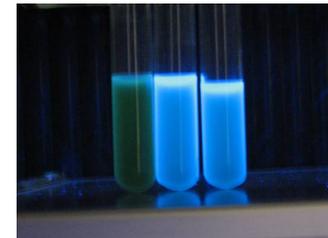
Выделение патогенного агента с помощью **биологической пробы**

Использование **транспортных сред** для доставки материала в Центры Индикации и диагностики и Центры верификации

Использование элективных и селективных **питательных сред** для выделения возбудителя и его идентификации.



Основное направление – создание хромогенных сред для эффективной диагностики



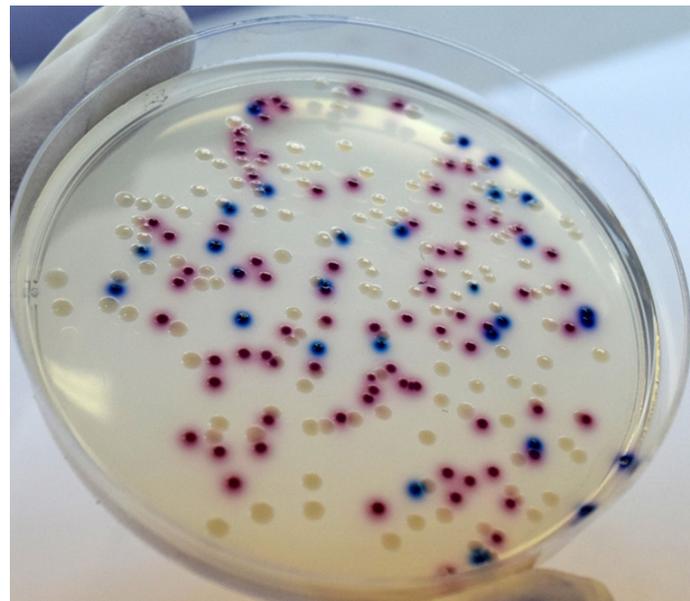
Всего выпускается **127** медизделий, **95** зарегистрировано (**67** сухие среды, **11** – экспресс-тесты)

ГНЦ ПМБ выпускает до **130** тонн сухих сред, занимая 50% рынка в России

# НОВЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ФБУН ГНЦ ПМБ – для КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

## НЕМЕДИЦИНСКИЕ ИЗДЕЛИЯ

- ❖ Среда КМАФАнМ (питательная среда для определения количества мезофильных аэробных и факультативно – анаэробных микроорганизмов)
- ❖ Железосульфитный агар типа Вильсон – Блэра (сульфитный агар)
- ❖ Забуференная пептонная вода
- ❖ Селенитовый бульон
- ❖ Магниевая среда
- ❖ MRS – агар ( Лактобакагар)
- ❖ ЕС – бульон
- ❖ ПАЛКАМ агар
- ❖ UVM бульон



# Среда КМАФАнМ для санитарно-бактериологических исследований



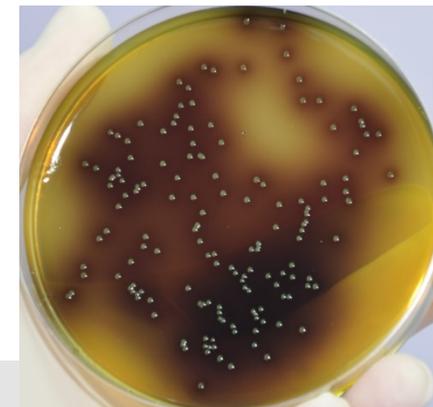
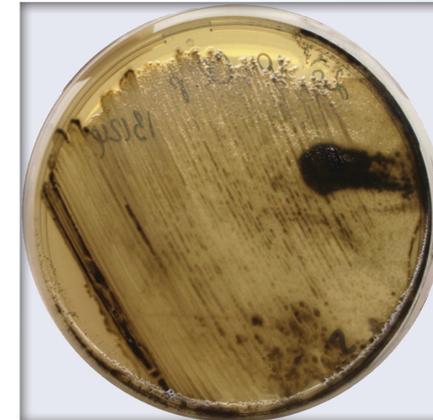
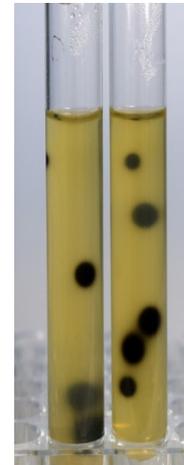
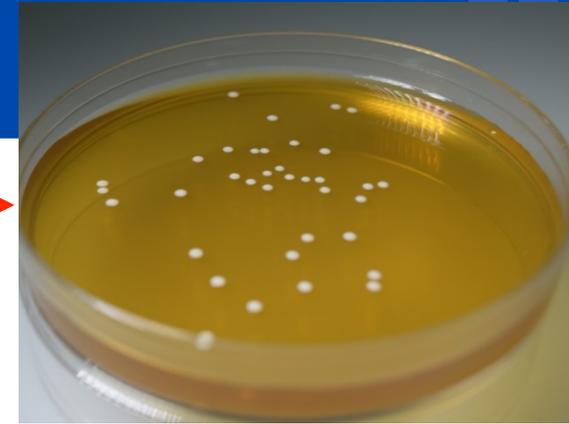
Для пищевых продуктов, фармацевтических и косметических продуктов, воды, объектов окружающей и производственной среды с целью определения общей бактериальной обсеменённости. Мезофильные аэробы и факультативны анаэробы.

# Новые отечественные среды для санитарной микробиологии

MRS АГАР для культивирования, выделения и подсчета всех видов *Lactobacillus* из пищевых продуктов и других тестируемых материалов. В атмосфере 5-10 % CO<sub>2</sub>

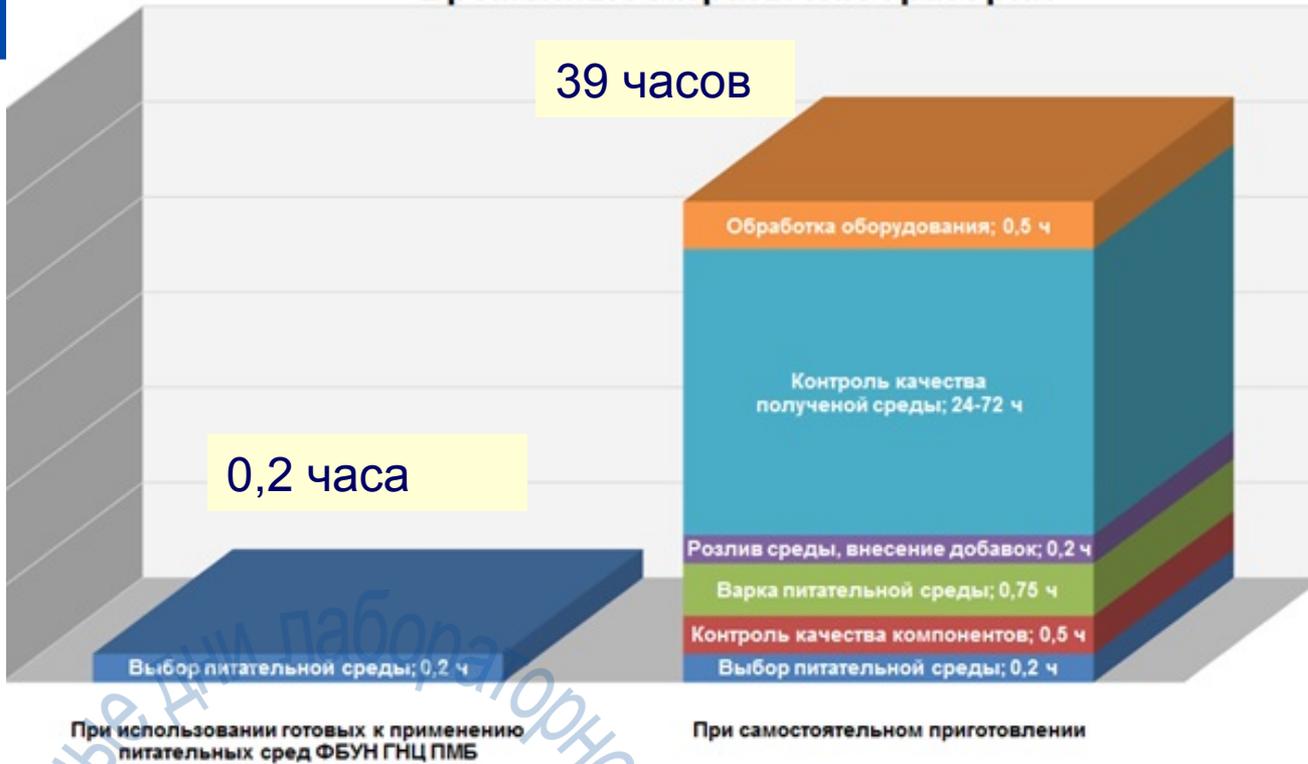
ЖЕЛЕЗОСУЛЬФИТНЫЙ АГАР для выявления сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях, в пищевых продуктах, воде, почве. *C. perfringens* ATCC 13124

СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИСТЕРИЙ обеспечивает рост листерий не позднее 48 ч инкубации и подавляет рост эшерихий, протеев и стафилококков.



# Готовые питательные среды

## Временные затраты лаборатории



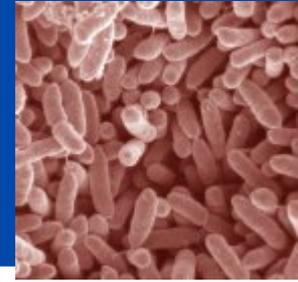
## Номенклатура

1. XLD –агар
2. Среда Эндо
3. Среда Левина
4. Висмут-сульфит агар
5. Маннит-солевой агар



**Преимущества готовых отечественных сред**  
Удобство использования, Стандартность, Время  
Сокращение количества персонала  
Экономия энергоресурсов, меньше оборудования  
Отсутствие контроля сред тест-штаммами – нет  
необходимости в Лицензии на 3-4 группу.

# Сферы инновационных разработок в области детекции патогенов



- ❖ Полногеномное секвенирование и биоинформатика – метагеномный анализ образцов
- ❖ Мультиплексная ПЦР в реальном времени
- ❖ Мультиплексная детекция с проточной цитометрией и сортированием микрочастиц
- ❖ Иммуно-ПЦР, технологии с МКА, аптамеры вместо антител
- ❖ Флуоресцентная микроскопия высокого разрешения, в том числе конфокальная
- ❖ Масс-спектрометрия и в сочетании с мультимерными протеомными технологиями (белки патогенов)
- ❖ Тесты для экспресс-диагностики на основе МКА (латексные, иммунохроматографические)
- ❖ Биологические чипы (на основе синдромного подхода) – наиболее реальные внедрения в отечественное производство собственных ридеров.
- ❖ Петлевая изотермическая амплификации ДНК (LAMP)

# Иммунохроматографические тесты

Основа – банк гибридом в «ГКПМ – Оболенск». 2 технологических линии

Хаузенги – тесты в  
пластиковом кожухе – 1  
тест

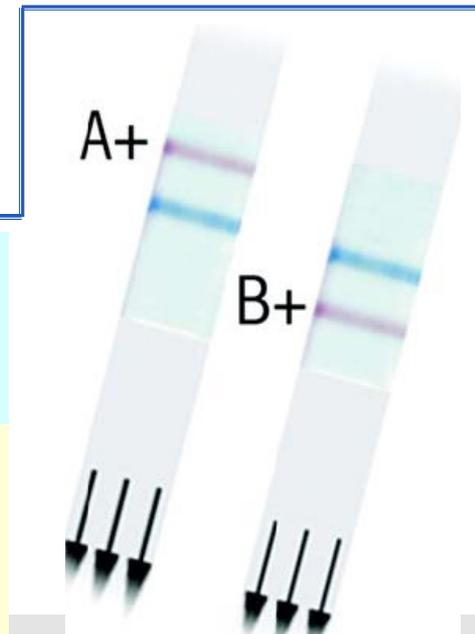
В упаковках по 10-20  
тестов. (созданы и  
испытаны для гриппа А)



Легионеллы, листерии, чума (+ антитела),  
туляремия, холера (+токсин), сибирская язва  
(+споры), грипп

Основная задача – поэтапная замена  
иммуносупензионных тестов на более чувствительные и  
удобные. Хранение 2 года при комн. температуре.

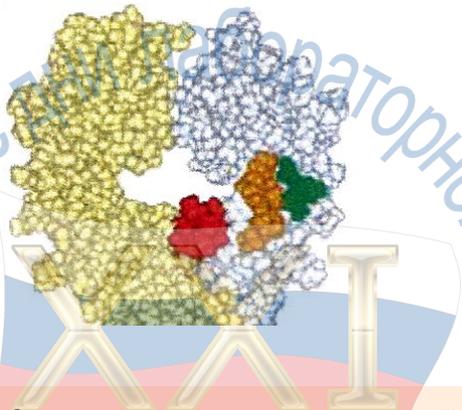
Апробированы для СПЭБ.



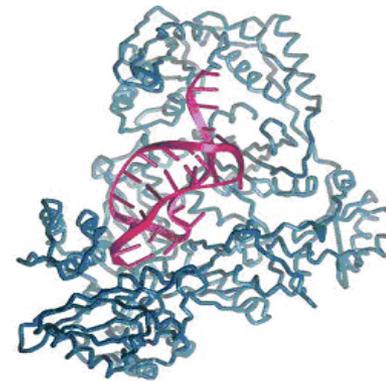
# АПТАМЕРЫ инновационные биодетекторы

**Аптамеры – фрагменты ДНК, специфичные к мишеням и отобранные методами высокопроизводительного скрининга *in vitro* из библиотек олигонуклеотидов.**

- Чувствительность превышает методы детекции на основе антител.
- Не зависят от иммуногенности мишени
- Хорошо хранятся.



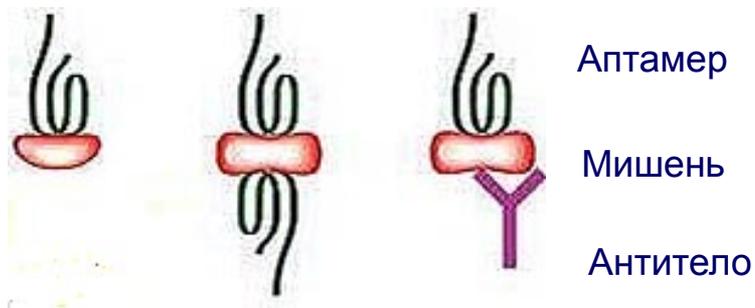
Аптамер к Fc-фрагменту IgG человека



РНК-аптамер в комплексе с тромбином

«Иммуно-аптамерный» ПЦР является одной из самых многообещающих технологий высокочувствительной детекции патогенов и их компонентов в ближайшем будущем.

# Разработанные аптамеры



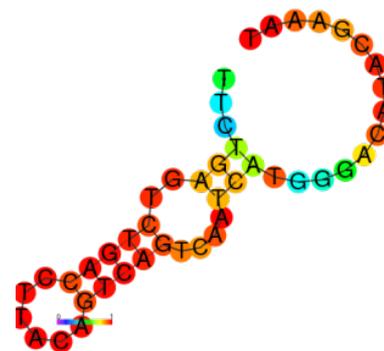
Аптамер

Мишень

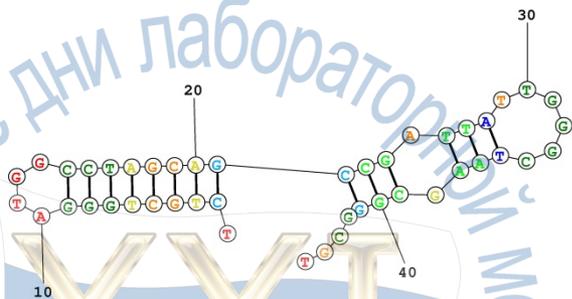
Антитело

Варианты формирования  
детекционного комплекса

```
TTCTGAGTCTGACCTTACAGTCAGTCAA  
TCATGGGACATACGAAAT
```



Первичная и вторичная  
структура аптамера,  
специфичного к микробным  
клеткам *E. coli* O157:H7



Аптамер к  
ботуло-  
токсину А

В 2012 году в ГНЦ ПМБ впервые получены аптамеры к патогенному штамму ***E.coli* O157:H7**, ботулотоксину и шига-токсину и разработаны тест-системы на их основе. Используются в Центре индикации и диагностики как дополнительные высокочувствительный тест при анализе образцов.

# Высокочувствительная биодетекция по иммуно-ПЦР

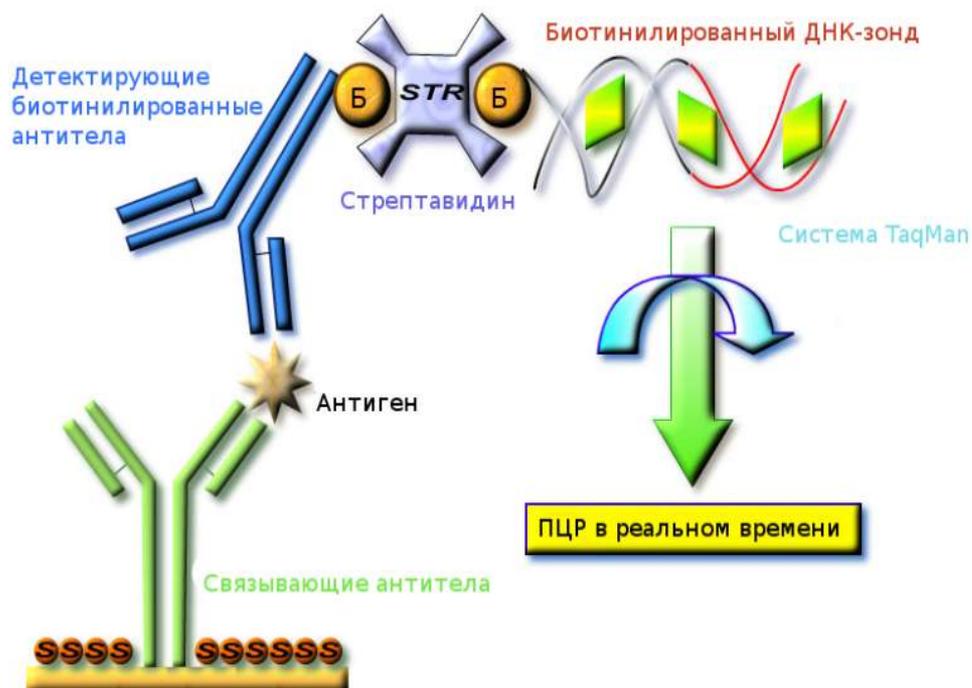
Иммуно-ПЦР совмещает преимущества ПЦР и иммуноанализа без пробоподготовки. Чувствительность до 1 пг\мл.

Сочетание RT-ПЦР и ELISA, фиксирующие и детектирующие (парные) МКА

образец - 1 мкл,  
время – 25 мин.,  
чувствительность -  
единичные бактерии и  
вирусы.

**В 100000 раз  
чувствительней ИФА.**

Для ООИ разработаны все отечественные моноклональные антитела



# Тест-системы для иммуно-ПЦР



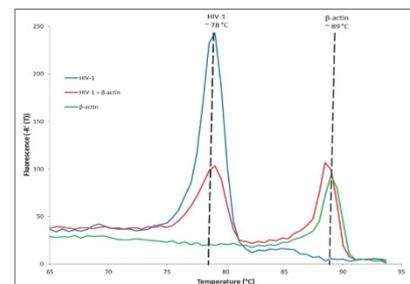
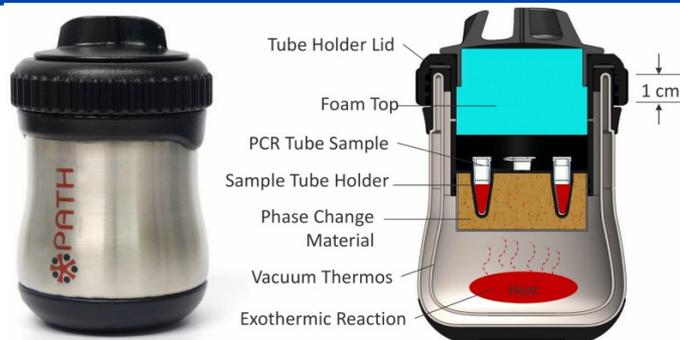
1. Определение **ботулинического нейротоксина типа А** методом иммуно-ПЦР (Тест-система «IPCR-BoNT/A»)
2. Определение **летального фактора сибирской язвы** методом иммуно-ПЦР (Тест-система ИПЦР-ЛФ)
3. Определение **протективного антигена возбудителя сибирской язвы** методом иммуно-ПЦР (Тест-система ИПЦР-ПА)
4. Набор реагентов для определения бактерий **E. coli O157:H7** методом иммуно-ПЦР (Тест-система «IPCR- E.COLI O157:H7»).
5. Набор реагентов для определения бактерий **Listeria monocytogenes** методом иммуно-ПЦР (Тест-система «IPCR - L. MONOCYTOGENES»).
6. Набор реагентов для определения бактерий **Pseudomonas aeruginosa** методом иммуно-ПЦР (Тест-система «IPCR - P. AERUGINOSA»).

# Петлевая изотермическая амплификации ДНК (LAMP) для полевых условий

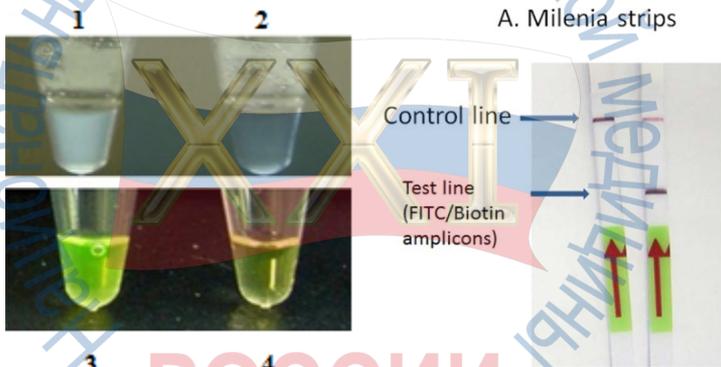
**LAMP** – амплификация ДНК, при постоянной температуре 60 - 65°C с замещением цепи. Выделение ДНК не нужно, не требуется амплификатор. В одной пробирке: буфер, ДНК-мишень, ДНК-полимераза, праймеры.

**Синтез мишени** с 2-мя или 3-мя наборами праймеров. Как правило, 4 различных праймера: F3 (прямой внешний), B3 (обратный внешний), FIP (прямой внутренний) и BIP (обратный внутренний).

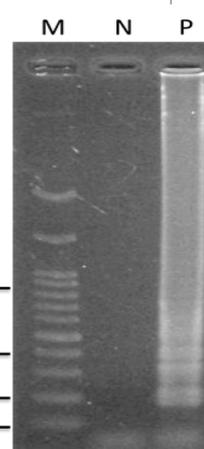
**Обнаружение** – электрофорез, фотометрия, визуально, ИХ-тесты, флуоресценция, в реальном времени с интеркалирующими красителями – количественно.



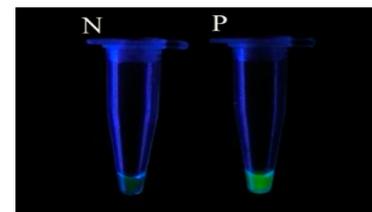
NALF detection



A

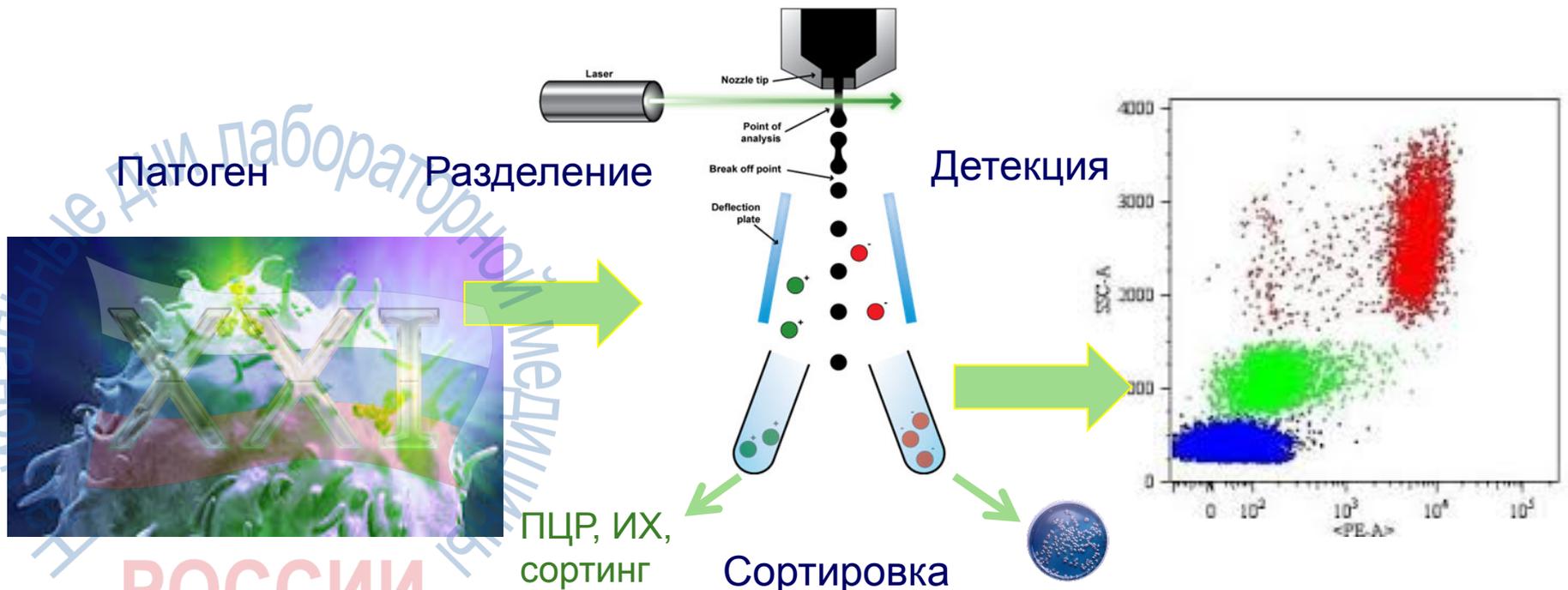


B



# Клеточный сортинг – повышение эффективности генодиагностики

- ❖ Клеточный сортинг - выделение индивидуальных клеток патогенов из сложных смесей с возможностью их культивирования и анализа гено- и иммуно- методами. Необходимы парные МКА.
- ❖ Применение в тандеме с полногеномным и/или метагеномным секвенированием позволяет идентифицировать патоген, и в течение 5-50 часов получить чистую культуру.



# Метагеномный анализ патогенов в пищевых продуктах



- ❖ «**Метагеном**» - генетический материал, получаемый напрямую из образцов.
- ❖ Секвенирование геномов полагается на культивируемые (1 % от общего числа микробов) клоны культур.
- ❖ Метагеномика работает с набором всех ДНК находящихся в среде.
- ❖ Метагеномного подход позволяет учитывать **некультивируемые микроорганизмы наряду с культивируемыми.**



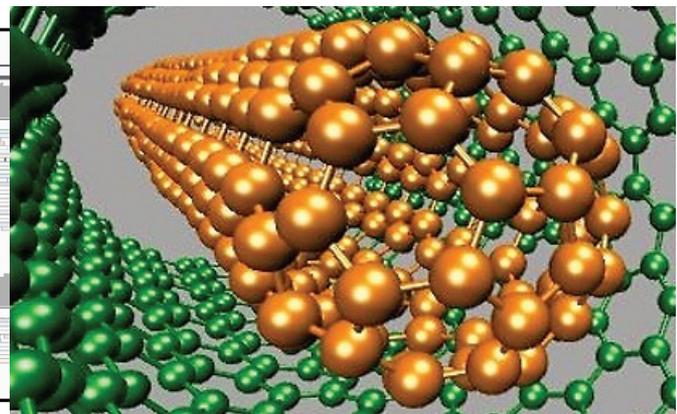
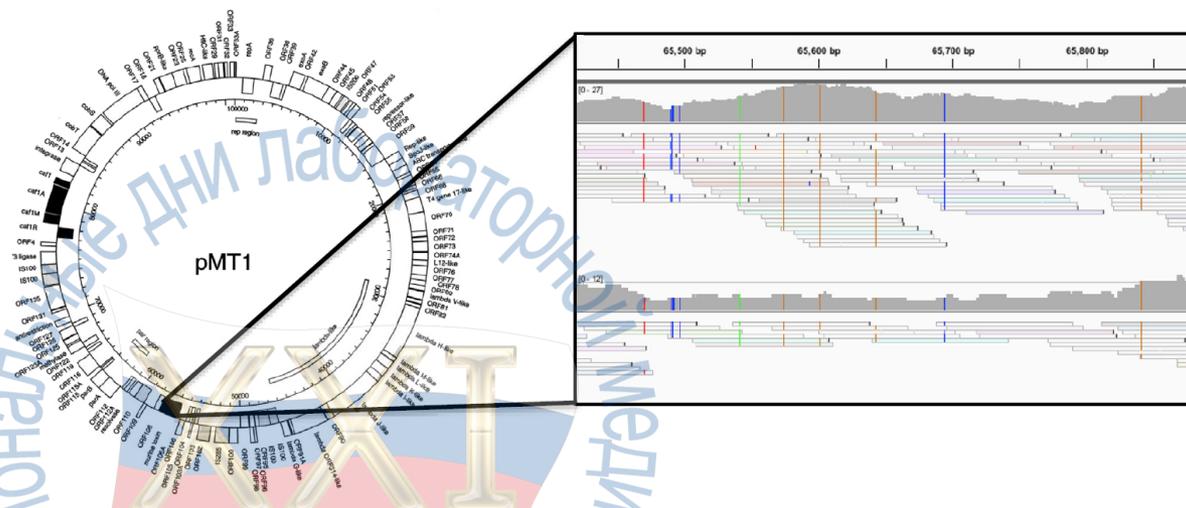
- в ближайшие годы станет основным методом идентификации и генотипирования
- идентификация патогенов одновременно с их молекулярно-генетической характеристикой (факторы вирулентности, антибиотикорезистентность)
- выявление источника заражения и происхождения штамма
- возможность идентифицировать редкие и новые патогены.

# Возможности метагеномики для биодетекции в реальном времени

## Potential Infectious Agents & Toxins

Genus and species	No. Reads (MegaBLAST)	MetaPhlAn abundance	No. Samples	Database
<i>Bacillus anthracis</i>	10,048	0.19	2	CDC
<i>Clostridium perfringens</i>	89,720	0.16	10	PATRIC
<i>Clostridium tetani</i>	61,718	0.17	9	PATRIC
<i>Escherichia coli</i>	3,484,839	5.69	68	PATRIC
<i>Shigella sonnei</i>	27,163	0.07	3	PATRIC
<i>Staphylococcus aureus</i>	648,471	1.09	65	CDC
<i>Yersinia pestis</i>	36,236	0.01	3	CDC

В метро Нью-Йорка - ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и других возбудителей  
2015 год журнал Cell Systems



по данным секвенирования выявлена плазида чумного микроба, однако, детальный анализ ридов позволяет обнаружить ошибки

# Использование ПЦР и секвенирования в палеомикробиологии

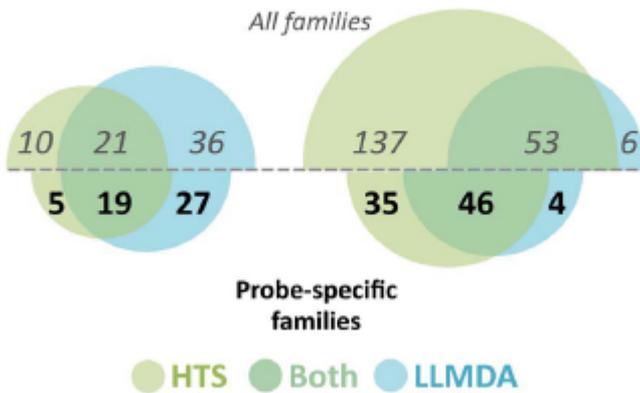


**Cholera victim #3090.13**

Intestine, 1849 AD

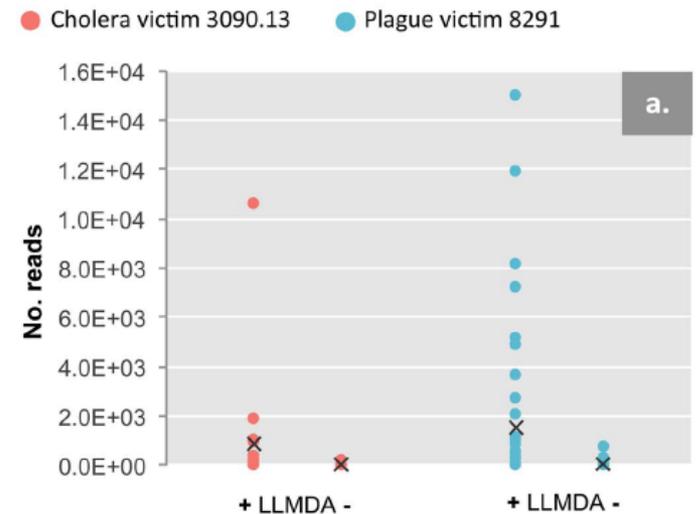
**Plague victim #8291**

Tooth, 1348 AD

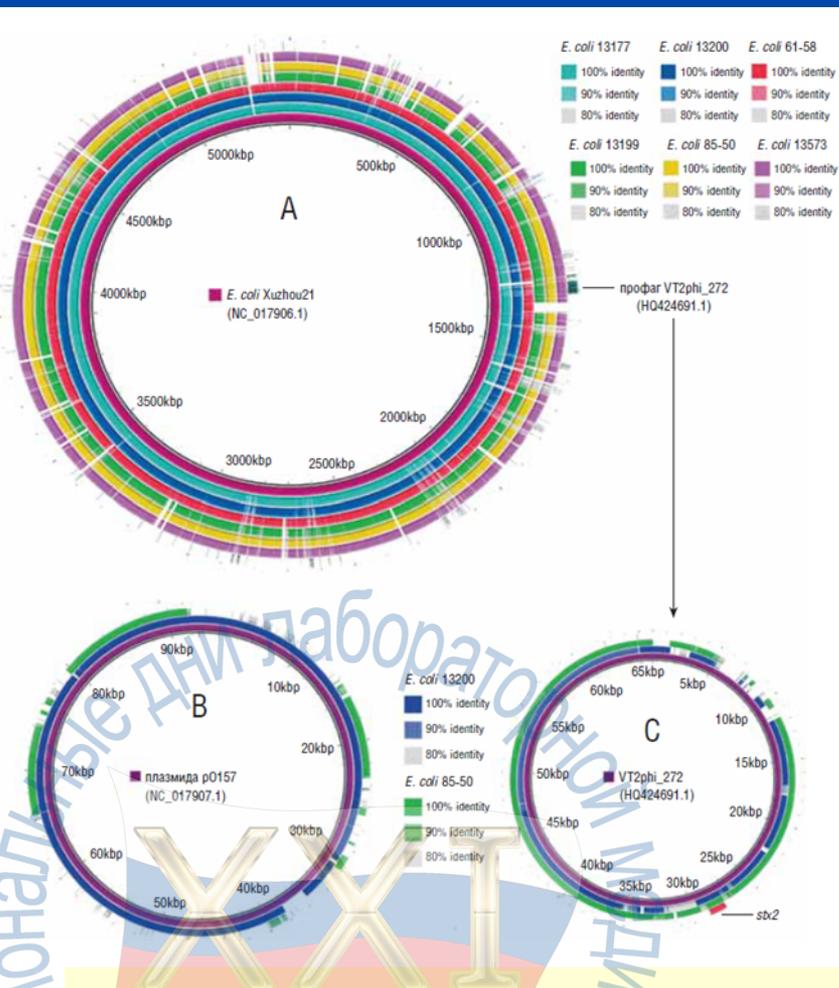


Останки содержат сильно деградированную ДНК, в которых патогенные таксоны – минорные компоненты.

Для выявления микробного разнообразия лучше использовать более дешевую, чем полногеномный секвенс технологию микроэреев, в частности Лоуренс Ливермор Микробную Детекцию. Здесь показано, что методы дают хорошо сопоставимые результаты по выявлению количества родов бактерий при холере (кишка) и чуме (зуб).



# Геномный анализ выпышки, вызванной STEC-штаммами с Санкт-Петербурге



Возраст, лет	Абсолютное число	%
<1	10	15,6
1–2	20	31,3
3–6	12	18,8
7–10	3	4,7
11–14	3	4,7
15–19	2	3,1
20–29	5	7,8
30–39	4	6,3
>40	5	7,8
Всего	64	100

Полногеномный сиквенс и MLST. Показана полная идентичность геномов штаммов *E. coli* O157:H7 13177, 13200 и 61-58, выделенных от больных. Геномы трех штаммов серогруппы O101 от ребенка и из молока, также идентичны друг другу.

В контигах при секвенировании STEC-штаммов (алгоритм de novo), выявлены все 15 участков генома, используемых для мультилокусного типирования высокопатогенных *E. coli* по схеме вебсайта shigatox.net

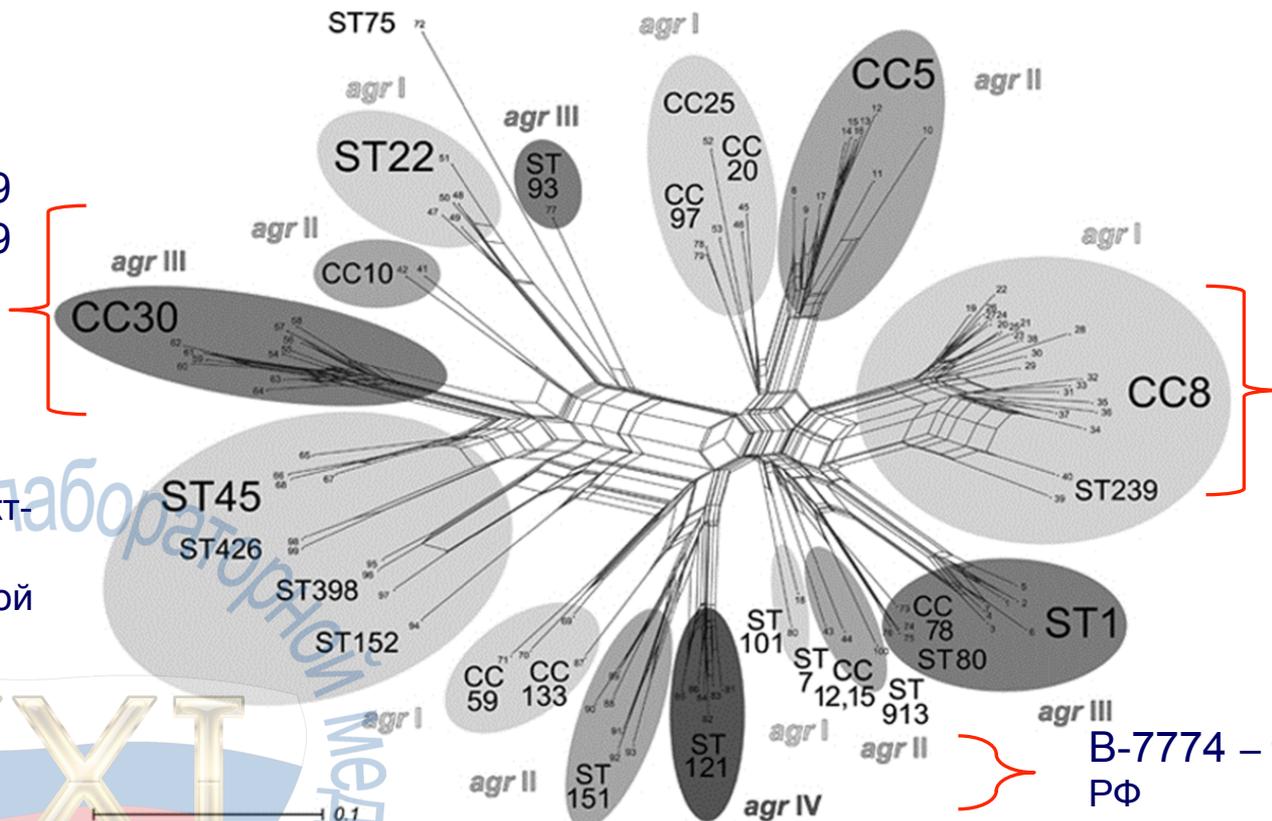
# Вспышки пищевой токсикоинфекции 2013-2014 год, вызванные *S.aureus*

год	Регион, контингент	Генетическая линия	Токсины	Число заболевших	Госпитализировано	Источник	
						Продукты	Персонал
2013	С-Пб рабочие	СС30 t2509	ЭТ - А ТТШ	363	223 (7 интенс. терап)	+	
2014	Мордовия, учащиеся СШ	СС12 t888	ЭТ - В	72	16	+	
2014	Тыва, учащиеся интерната	СС22 t156	ЭТ - С	2	2 (1 летал)		+
2014	Тверская область, лагерь Селигер	СС30 t122	ЭТ - А ТТШ	145	38	+	+
2014	Поезд Абакан-Москва	СС5 t002	ЭТ - А ТТШ	378	58	+	+
2014	Ульяновская область	СС1	ЭТ-А	46	2	+	
<b>ВСЕГО</b>				<b>1006</b>	<b>339</b>		

# Полногеномные последовательности *S. aureus*, исследованные в ГНЦПМБ

## CC30

B-7438/B-7439  
B-7778/B-7779  
Возбудители  
пищевых  
токсико-  
инфекций -  
массовые  
вспышки в Санкт-  
Петербурге  
(2013) и Тверской  
области (2014)



## CC8

B-7772/ B-7772  
- новый  
возбудитель  
стафилодермии  
новорожденных  
=> расширение  
экологической  
ниши CC8

B-7774 – типичный для  
РФ  
возбудитель  
стафилодермии  
новорожденных CC15

## CC15

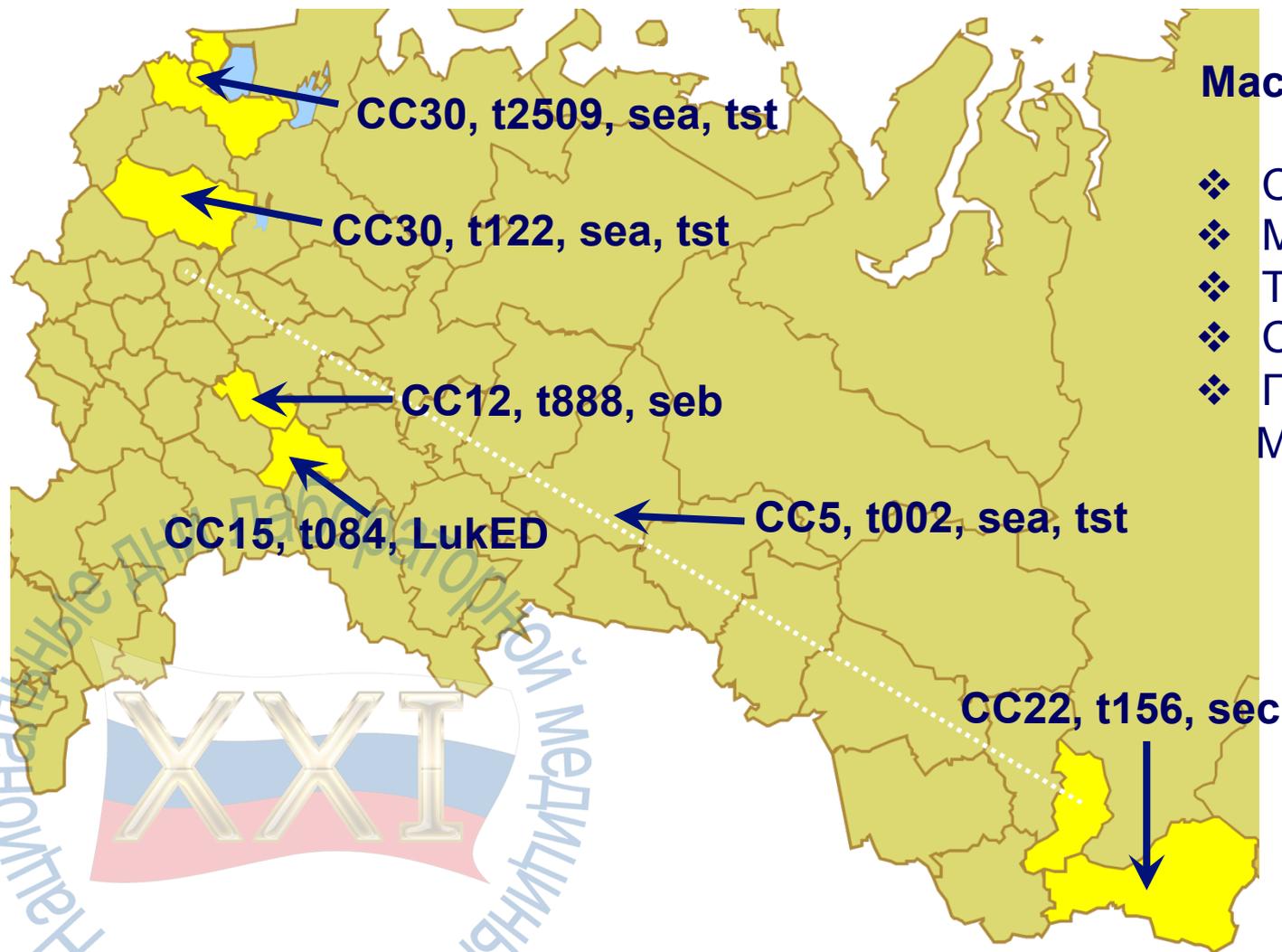
Monecke et al. 2008. FEMS Immunol Med Microbiol

# ЭКСФОЛИАТИВНЫЙ ДЕРМАТИТ НОВОРОЖДЕННЫХ

Год	Регион, контингент	Клональная линия <i>S. aureus</i>	Токсины, MRSA	Число изолятов
2012	Оренбургская обл., ООКБ, новорожденные	СС121 t272	Эксфолиативные токсины А и В	14
2013	Белгородская обл., ГДБ, новорожденные	СС15 t084	Эксф. токсин А	20
2014	Белгородская обл., ГДБ и ДОКБ, новорожденные	СС8 t211	Эксф. токсин А MRSA	19
2014	Оренбургская обл. ГБУЗ ОКПЦ	СС12 t156		22
2014	Псковская обл. Перинат. Центр.	СС12 t084	Эксф. токсин А	27
2014	Оренбургская обл. ГКБ №2	СС15 СС121	Эксф. токсины А и В	67
2015	Сахалинская обл. ОБ	СС121	Эксф. токсин А	52

# ПИЩЕВЫЕ ТОКСИКОИНФЕКЦИИ

## клональные линии, spa-типирование, токсины



### Массовые вспышки:

- ❖ Санкт-Петербург,
- ❖ Мордовия,
- ❖ Тыва,
- ❖ Селигер,
- ❖ Поезд Абакан-Москва.

# Идентификация и типирование *Staphylococcus aureus*

## Чистая культура

Молочно-желточно-солевой  
агар (10% NaCl)  
Кровяной агар (гемолиз)

## Генотипирование

**coa-ПЦР-ПДРФ, spa-  
MLST-, agr-**

Биоанализ данных  
Генетическая линия

Частота выделения в мире  
штаммов данной линии

## Видовая идентификация

ПЦР-идентификация

Определение генов *nuc*, *coa*, *femA* – выявление  
клинически важных видов *S. aureus* и *S. epidermidis*

MALDI Biotyper

## SCCmec-типирование

МПК – тест на уровне  
фенотипа

**ПЦР-тест на SCCmec  
кассету (генотип MRSA)**

Определение гена *mecA*

ПЦР-тесты на тип

SCCmec кассеты

Определение

комбинаций *mec* и *scg*

генов, всего 16

вариантов

Определение SCCmec

типа по *j*-региону

## Типирование по генам токсинов

ПЦР-тест на токс-гены:

**Лейкоцидин Пентона-  
Валентайна**

**Токсин синдрома  
токсического шока**

**Эксфолиативные  
токсины А и В**

**Гемолизины А и В,  
Энтеротоксины А, В, С,  
D, E**

**Энтеротоксин-подобные  
токсины.**

Всего 14 типов.

**Полногеномное  
секвенирование *S. aureus***

Красным - тесты в пределах 10 ч

# Пример мультиплексной ПЦР. Одновременное выявление чумы, сибирской язвы и туляремии в RT-PCR

Возбудитель	Мишень	Последовательность
<i>Y. pestis</i>	Yp_ypo2088_up	cga-gta-ggg-tta-ggt-ggg
	Yp_ypo2088_low	ccg-tcc-aat-gca-tgt-tag-acc-a
	Yp_ypo2088_Pr_up	<b>(ROX)</b> tc-cat-ttc-atg-gcg-gta-ata-tcg-gga- <b>(RTQ2)</b>
<i>B. anthracis</i>	sspE_up	agc-aaa-cgc-aca-atc-aga-ag
	sspE_low	acg-tct-gtt-tca-gtt-gca-aat-tct-gta-cc
	sspE_Pr_up	<b>(FAM)</b> ct-ggt-gct-agc-att-caa-agc-aca-aat-gct- <b>BHQ1)</b>
<i>F. tularensis</i>	ISFtu5_up	gcc-gtg-tga-act-tta-ctt-tgg-t
	ISFtu5_low	tcc-tcg-tgt-aca-gag-cga-atc
	ISFtu5_Pr_up2	<b>(R6G)</b> ac-ggt-cgt-tgt-gta-aaa-atc-aac-cac-atc- <b>(RTQ2)</b>

# Пример подвижной дифференциация в ПЦР *Francisella tularensis* с помощью одного праймера

Электрофореграмма ампликонов, полученных в ПЦР с праймером **Chi1f** и ДНК *F. tularensis*:

1–11 – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder;

2 – subsp. *holarctica* 15;

3 – subsp. *holarctica* 503;

4 – subsp. *holarctica* bv. *japonica* Miura;

5 – subsp. *holarctica* bv. *japonica* Jasoe;

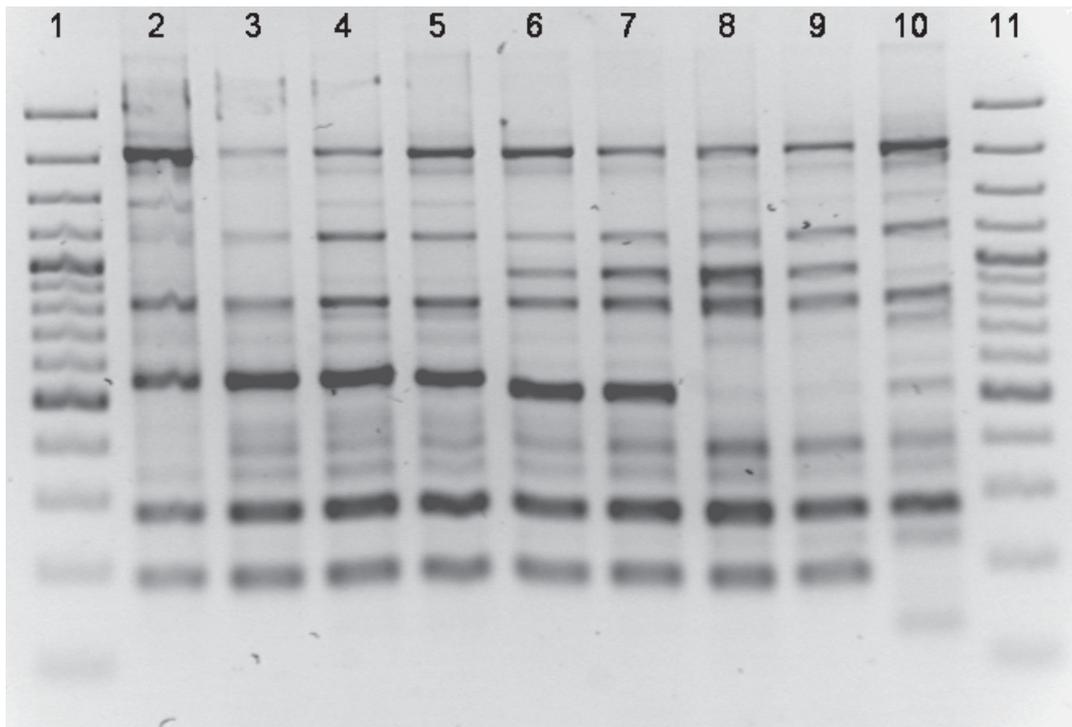
6 – subsp. *tularensis* 8859;

7 – subsp. *tularensis* Schu;

8 – subsp. *mediasiatica* 120;

9 – subsp. *mediasiatica* 117;

10 – subsp. *novicida* Utah 112



Штаммы разных регионов имеют **характерное распределение полос по интенсивности и размерам**. Выделено **пять характерных областей электрофореграмм**.

# Продолжение изучения энтероаггративных эшерихиозов

Штамм E.coli O104:H4 – вспышка 2011 года в Германии.

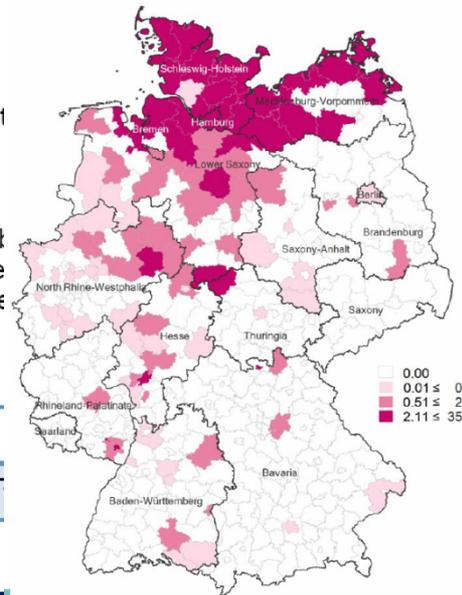
**Устойчивость к 14 антибиотикам.**

Разработаны среды, МР-ПЦР, латексные тесты, ИХ-тесты, бактериофаги для диагностики, полная лабораторная схема исследования.

To the recipient laboratory:

State Research Centre for Applied Microbiology & Bio  
Moscow Region, Russia  
Dr Anisimov

Please find enclosed a stabbed culture of the German out  
The original strain has been provided by the National Refe  
and other Enterics at the Robert Koch Institute and has the



Strain	Serogroup	Genotype
11 2027	O104:H4	<i>eae- vtx2+, H</i>

**3842** случая

2987

Не ГУС STEC

855

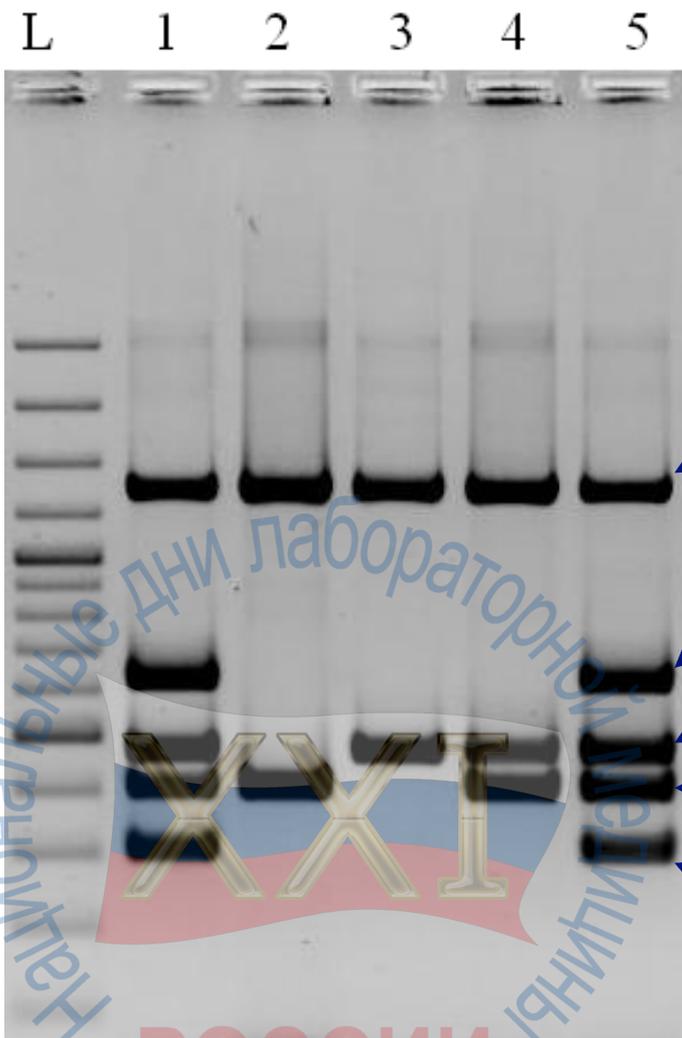
ГУС

18 умерло  
(0.6%)

35 умерло  
(4.1%)



# Результаты МР-ПЦР с праймерами «Мульти-O104»



Созданы и зарегистрированы ПЦР и РТ-ПЦР

16S  
RNA

pVCD  
43332

stx 2

rfb<sub>104</sub>

fliC<sub>H4</sub>



- ❖ 1, 5 – *E.coli* O104:H4 (Германия)
- ❖ 2 – *E.coli* O104:H12
- ❖ 3 – *E.coli* O157:H7
- ❖ 4 – *E.coli* O104:H12 + *E.coli* O157:H7
- ❖ L – маркер м. м.

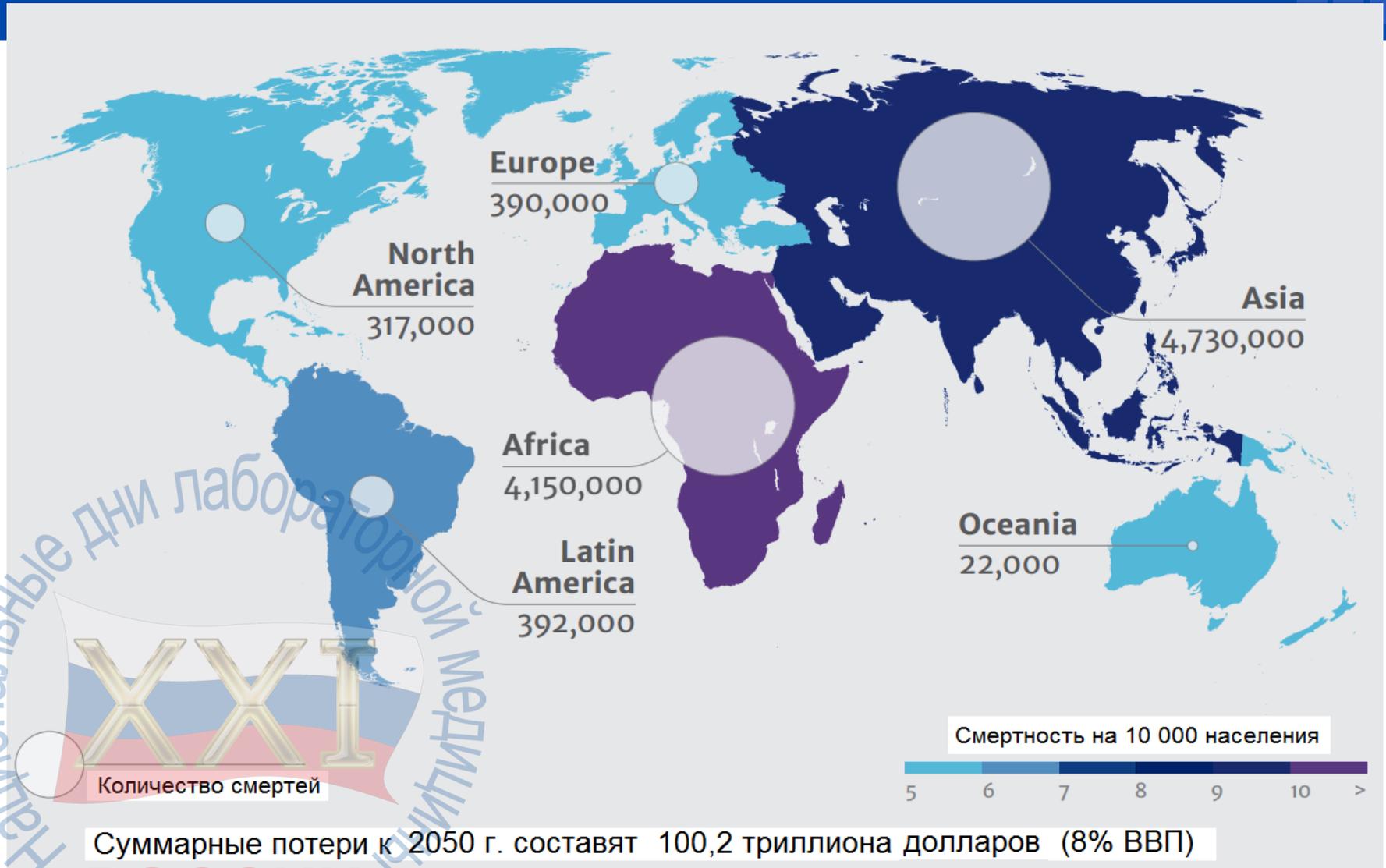
# Хронология распространения высоковирулентного штамма *E.coli* O104:H4



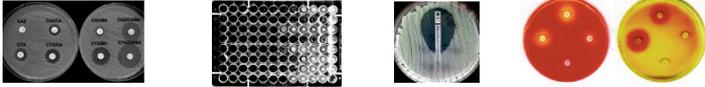
- ❖ Agg-STEC штаммы O104:H4 начали регистрировать с 2001 года, до 2009 г. - 5 спорадических случаев выявления у больных с ГУС в Германии, Франции, Норвегии и Италии.
- ❖ В 2009 г. - 25 случаев больных с ГУС в Грузии - 25 человек заболело, 7 умерло, выделены 2 штамма *E. Coli* O104:H4 с генами *stx2a*, *aggR* и *aatA*, штаммы близки к штаммам из Германии 2011 года. Публикации только через 5 лет.
- ❖ «Германские» штаммы, в отличие от «грузинских» несли ранее неописанную у эшерихий плазмиду с гомологией с плазмидой вирулентности *Yersinia Pestis* pMT. Редкий случай у кишечных инфекций.
- ❖ 2011 г. вспышка ГУС у 8-ми французских туристов, вернувшихся из Турции  
2011 г. ещё 9 случаев выделения штамма от больных с ГУС во Франции Дании, Люксембурге и Германии.
- ❖ 2013 г. в Бельгии штаммы были выделены от больного, после посещения Туниса и от ребенка, после посещения Турции. Оба штамма несли основные гены вирулентности, идентичные «Германским» штаммам, а именно: *stx2a*, *aggR* и *aaiC*.

**Ни в одном случае не установлен источник заражения**

# Прогноз ежегодной смертности из-за антибиотикорезистентности к 2050 г.



# Детекция и изучение механизмов АБ-резистентности



## Фенотипические методы:

Диско-диффузионный метод

Метод двойных дисков (ингибиторы БЛ),

Метод Е-тестов, МПК, Хромогенные ПС

(бета-лактамазы), Модифицированный

Ходж-тест (бета-металло-лактамазы)

Впервые разработана и  
зрегистрирована среда **Мюллер**  
**Хинтон** (ГНЦ ПМБ)



## Биохимические методы:

Энзиматическое определение  
фермента

(проба с нитроцефином на бета-  
лактамазы)

Изоэлектрическая фокусировка белков

Спектрофотометрическое определение  
(расщепление антибиотика)

Белковый электрофорез

(наличие пориновых белков)

## Молекулярно-генетические методы:

Детекция генов ПЦР в классическом режиме :

Гены бета-лактамаз типов TEM, SHV, CTX-M,  
AmpC, OXA;

Гены карбапенемаз VIM, IMP, KPC, OXA-48, NDM1;

Генетические кассеты устойчивости к  
аминогликозидам, сульфаниламидам,  
хлорамфениколу, эритромицину и др.;

Плазмидные гены устойчивости к фторхинолонам  
*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*;

Гены эффлюксных насосов *cmiA1*, *AdeR*

Гены пориновых белков OmpK36, OmpA;

Детекция генов ПЦР в реальном времени:

Ген карбапенемазы NDM1

## Молекулярные механизмы распространения генов

Мобильные генетические элементы *ISEcp1*, *IS26*,  
*IS903*, *orf513*, *orf477*, *mucA*;

Интегроны классов 1 и 2: *int1*, *int2*, *ins1*, *ins2*;

Группы несовместимости плазмид *Inc*;

Сиквенс-типы штаммов (MLST)

Плазмидные профили

Конъюгация, трансформация

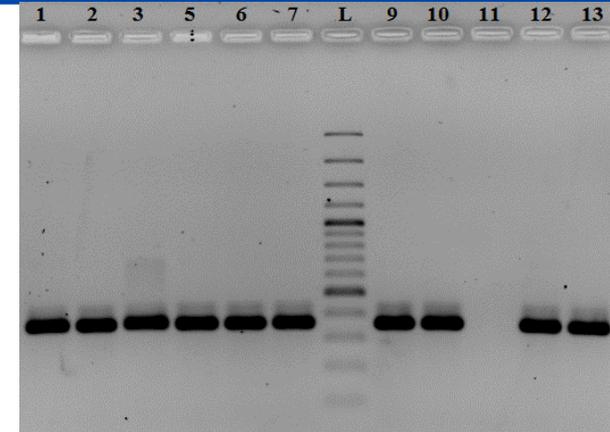
Секвенирование

Биоинформационный анализ

**Технологии биочипов**

# Acinetobacter baumannii

Антибиотик	A. baumannii				
Ампициллин	R	R	R	R	R
Ампициллин/ сульбактам	R	R	R	R	R
Цефуроксим	R	R	R	R	R
Цефуроксим аксетил	R	R	R	R	R
Цефокситин	R	R	R	R	R
Цефтазидим	R	R	R	R	R
Цефтриаксон	R	R	R	R	R
Цефоперазон/ сульбактам	R	R	R	R	R
Цефепим	R	R	R	R	R
Эртапенем	-	-	-	-	-
Имипенем	R	R	R	R	I
Амикацин	-	-	-	-	-
Гентамицин	R	R	R	S	R
Тобрамицин	R	R	S	S	R
Налидиксовая кислота	R	R	R	R	R
Ципрофлоксацин	R	R	R	R	R
Тетрациклин	S	S	S	S	S
Тайгециклин	S	S	S	S	S
Нитрофурантоин	R	R	R	R	R
Хлорамфеникол	R	R	R	R	R
Триметоприм/ сульфаметоксазол	R	R	S	R	R



Идентификация методом ПЦР с праймерами на видоспецифические для *Acinetobacter baumannii* гены *bla*<sub>OXA-51</sub>-like.

**ПАНРЕЗИСТЕНТНОСТЬ**

Устойчивость к впервые созданному и запатентованному бактериофагу AP22 против ацинетобактера.

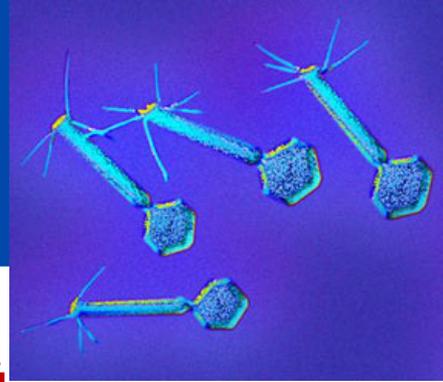


# Преодоление АБ-резистенности

- Бактериофаги и их литические ферменты-эндолизины
- Поиск новых ингибиторов ферментов, разрушающих антибиотики (например металло-бета-лактамаз NDM)
- Антибиотики с новыми свойствами
- Пробиотики на основе бактерий-антагонистов
- Пептиды эукариот – дефинсины
- Бактериоцины - низкомолекулярные (3-5 кДа) пептиды
- Борьба с биопленками
- Вещества комбинаторной химии – воздействие на новую мишень
- Изучение индукции устойчивости к дезинфектантам на генетическом уровне – выбор новых композиций
- Концепция дормантных патогенов – борьба с

Несмотря на обилие направлений, антибиотики остаются наиболее действенным антимикробным средством и задачей сегодняшнего дня является их рациональное использование, комбинирование для преодоления устойчивости

# Проблемы терапевтического использования фагов



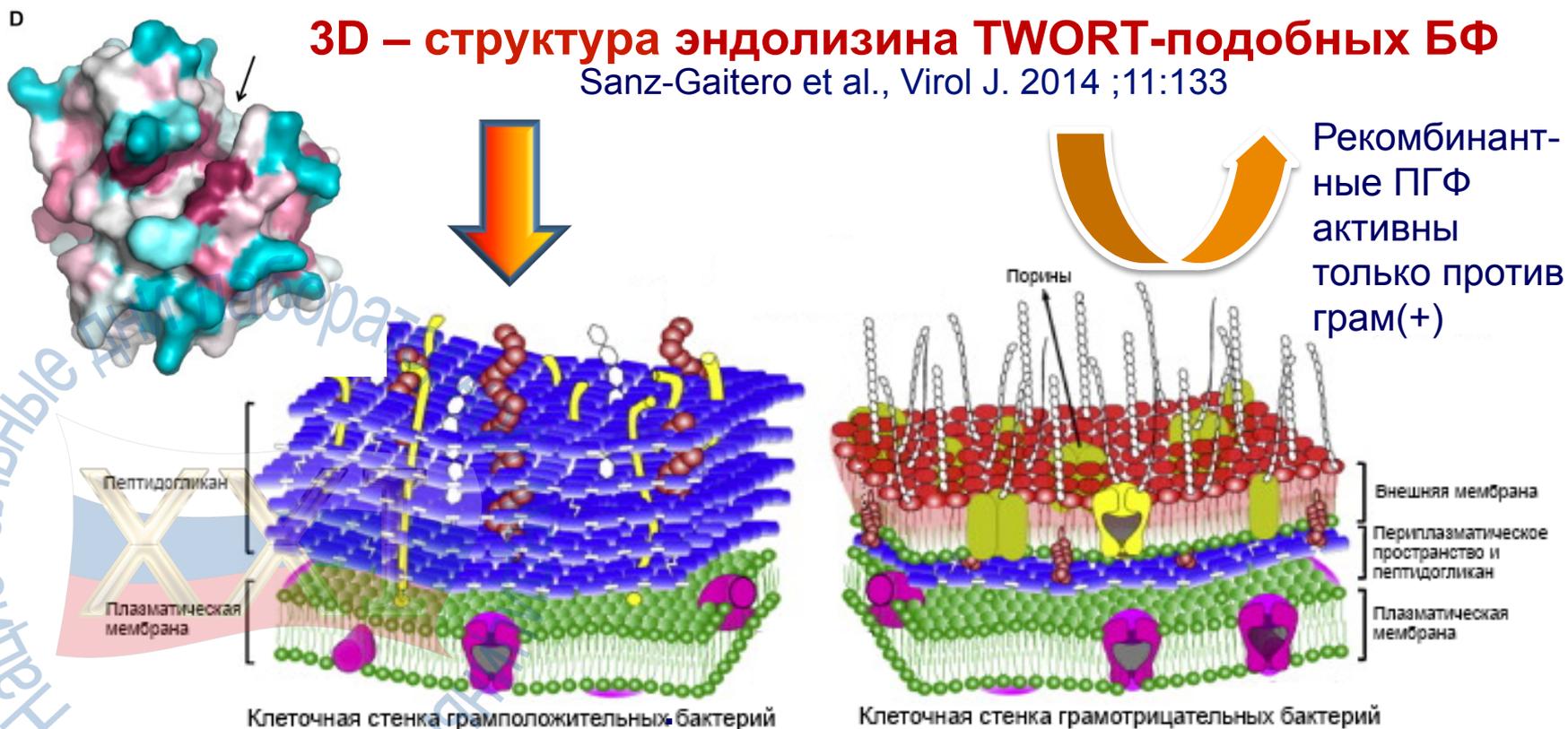
- ❖ **иммунные реакции**
- ❖ **быстрое высвобождение токсинов при лизисе бактерий**
- ❖ **перенос факторов вирулентности, токсинов, АБ-R-генов**
- ❖ **быстрая индукция устойчивости у патогенов**
- ❖ **трудности в определении эффективной дозы**

## Пути преодоления

- **Иммуногенность может быть снижена с использованием технологий «деиммунизации» белков при модификации Т-клеточных эпитопов**
- **Избежать токсического шока при лизисе можно при создании эндолизин-дефицитных бактериофагов, убивающих клетки, но не лизирующих их**
- **Обязательное секвенирование и биоинформационный анализ**
- **Только 1-2-х кратное точечное применение – исключение масштабного использования для дезинфекции**
- **Конструирование рекомбинантных фагов избирательно лизирующих только АБ-резистентные штаммы бактерий – ключевая технология преодоления АБ-R**

# Пептидогликангидролазы (эндолизины) бактериофагов

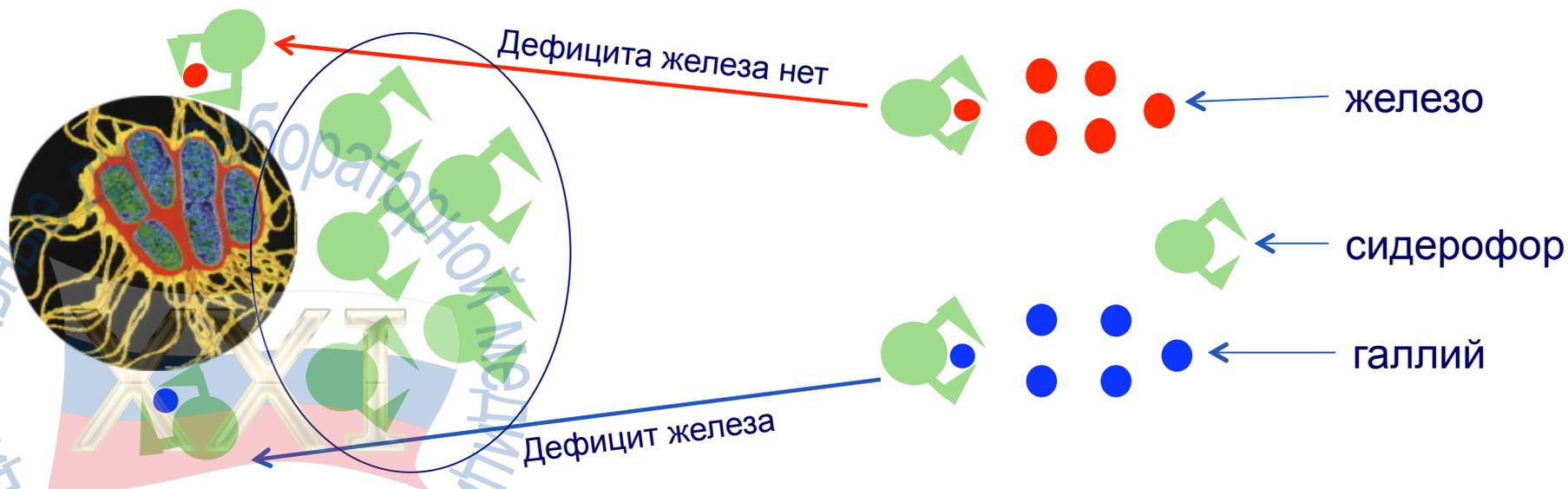
Показана высокая эффективность, отсутствие индукции резистентности и безопасность при парентеральном введении эндолизинов. В ГНЦ ПМБ клонированы эндолизины *S. aureus*.



# Социомикробиология (пример)

Блокирование коммуникаций между клетками микробного сообщества – медленная выработка или нет резистентности, так как клетка не закрепляет ее в потомстве.

Клетки *P. aeruginosa* выделяют сидерофоры в один момент для адсорбции железа, которые используются многократно всей популяцией. Внесение в среду галлия блокирует сидерофоры и популяция остается без источника железа. Мутация по сидерофору галлий(-) не дает преимущества клетке, так как та будет использовать сидерофоры и других клеток.



Подтверждение эволюционной теории: если мишень ЛС – общественный продукт, то резистентность не возникает.

# ИМПОРТОЗАМЕЩЕНИЕ трансфер зарубежных технологий

- ❖ **Из стран БРИКС и их промышленное освоение** : Агар с сердечно-мозговой вытяжкой (Brain-heart infusion agar); Бульон с сердечно-мозговой вытяжкой (Brain-heart infusion broth); Основа колумбийского агара для высоко требовательных микроорганизмов; Двухфазная система для гемокультур; Основа кровяного агара; Желчно-эскулиновый агар для энтерококков; Среды для стрептококков; Бульон MRS; Шедлер агар для анаэробов.
- ❖ **Производства хромогенных питательных сред из стран БРИКС**: Хромогенный агар для *E. coli* O157; Основа хромогенного агара МакКонки с сорбитом; Хромогенный агар для энтерококков; Основа хромогенного агара для листерий; Хромогенный бульон для колиформных бактерий и *E. coli*; Хромогенный агар для выделения метициллин-устойчивых *S. aureus* (MRSA агар); Хромогенный агар для грибов рода *Candida*; Хромогенный агар для определения энтеробактерий, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия; Хромогенный агар для выделения, подсчета микроорганизмов в моче и прямой идентификации *E. coli*, *Enterococcus*, группы KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) и *Proteeae*.
- ❖ **Механизм трансфера**. Заключение с фирмой HiMedia (Индия) соглашения о сотрудничестве в 2 этапа. На 1-ом этапе передача питательных сред в ФБУН ГНЦПМБ крупными партиями до 20 кг (in bulk) с последующей фасовкой в нашем Центре в обычные банки вместимостью 0,5 л с отсроченным платежом. На 2-ом этапе передача технологий по лицензионному договору в ФБУН ГНЦПМБ с последующей организацией производства на технологической линии Центра

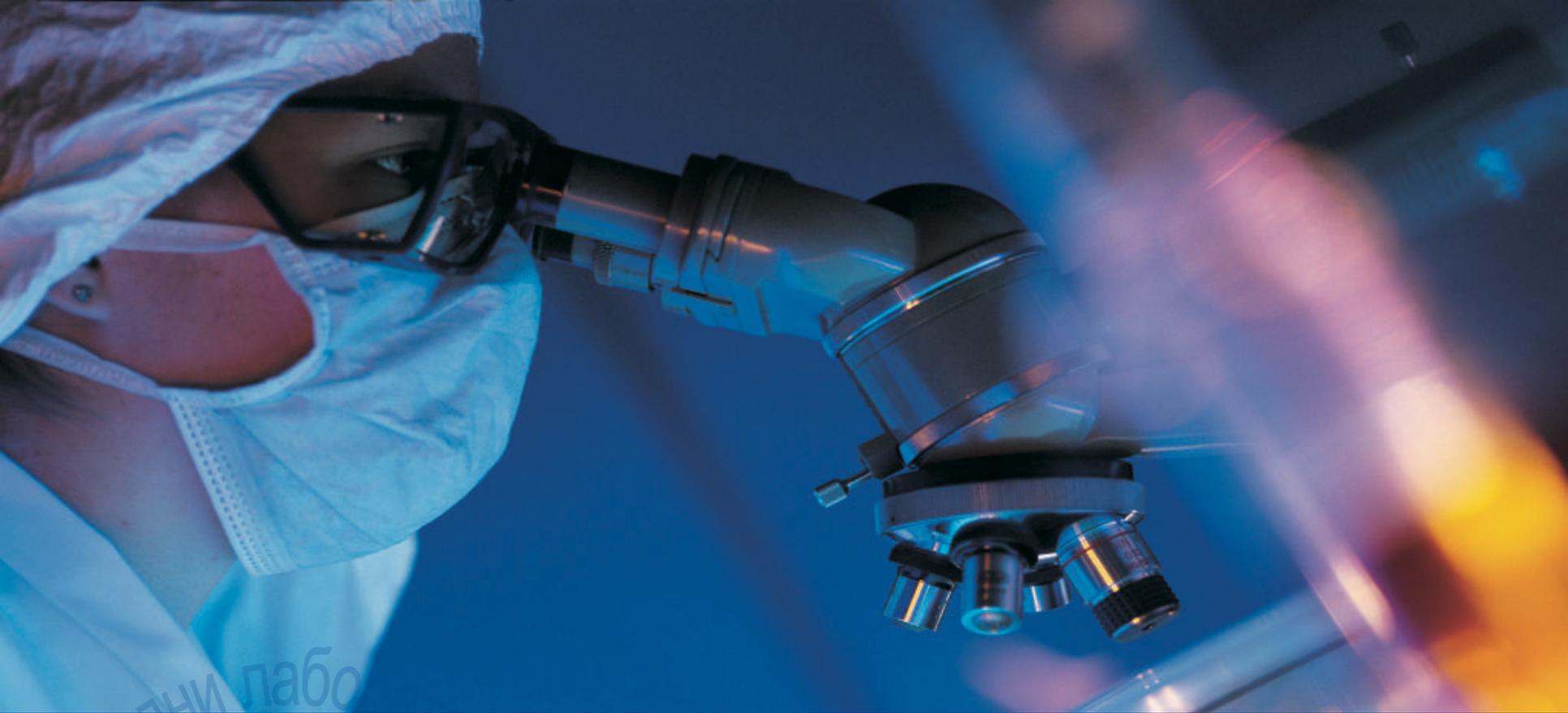
# ИМПОРТОЗАМЕЩЕНИЕ производство транспортных систем

- ❖ Субсидии Министерства промышленности и торговли РФ - по теме «Разработка технологии и организация производства импортозамещающих медицинских изделий: бактериологические транспортные системы» в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».
- ❖ Будет разработана технология и организовано производство стерильных транспортных систем, содержащих следующие транспортные среды: Среда Кери-Блэра; Среда Эймса; Среда Эймса с углем; Среда Стюарта; Специальные транспортные среды для отдельных видов микроорганизмов. Одноразовые стерильные сухие пробирки с вмонтированным тампоном-апликатором (тупферы).

# ИМПОРТОЗАМЕЩЕНИЕ

## производство готовых питательных сред

- ❖ **Номенклатура:** Селективный агар для устойчивых к ванкомицину энтерококков; Висмут-сульфит агар для выделения сальмонелл, в частности *Salmonella typhi*, Агар Левина для дифференцирования микроорганизмов кишечной группы; Агар Мак-Конки – селективная среда для выделения сальмонелл, шигелл, колиформных бактерий из мочи, пищевых продуктов, сточных вод и др.; Среда Левнштейна-Йенсена для диагностики туберкулеза в пробирках; Среда Финна-2 для диагностики туберкулеза в пробирках; Агар XLD для выделения и подсчета *Salmonella typhi* и других сальмонелл; SS агар – селективный агар для шигелл и сальмонелл; Питательные среды для диагностики особо опасных инфекций (туляремии, чумы, сибирской язвы, холеры, бруцеллеза, легионеллеза и др); Кровяные питательные среды; Шоколадный агар.
- ❖ Предполагается выполнение проекта из **собственных средств** производственной деятельности.
- ❖ **Перспектива.** Распространение данных производств по стране.



Спасибо за внимание!

РОССИИ

