

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РОДА ENTEROVIRUS

Учебно-методическое пособие

Тольятти
Издательство ТГУ
2012

Министерство образования и науки Российской Федерации
Тольяттинский государственный университет

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД
ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
РОДА *ENTEROBACTER***

Учебно-методическое пособие

Тольятти
Издательство ТГУ
2012

УДК 579.61:579.842.17(075.8)

ББК 52.649.222.1я73

П64

Рецензент:

д-р мед. наук, профессор Ульяновского государственного
университета *А.С. Нестеров*;

Авторы:

Н.И. Потатуркина-Нестерова, И.С. Немова,
М.Н. Артамонова, О.Е. Беззубенкова

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные
и научно-педагогические кадры инновационной России»
на 2009–2013 гг.

П64 Потатуркина-Нестерова, Н.И. Молекулярно-генетический метод исследования возбудителей рода *Enterobacter*: учеб.-метод. пособие / Н.И. Потатуркина-Нестерова [и др.]. – Тольятти : Изд-во ТГУ, 2012. – 32 с. : обл.

Учебно-методическое пособие содержит информацию об использовании полимеразной цепной реакции в исследовании бактерий рода *Enterobacter*. Представлены общие данные о ПЦР как методе диагностики инфекционных заболеваний, особенностях энтеробактеров и вызываемых ими заболеваний. Освещены вопросы о возможности использования ПЦР в идентификации изучаемых бактерий рода *Enterobacter*, а также изучении генов антибиотикорезистентности.

Предназначено для студентов специальностей «Лечебное дело», «Педиатрия», «Фармация», может быть полезно для врачей любых клинических специальностей и научных работников, биологов (микробиологов, бактериологов, иммунологов).

УДК 579.61:579.842.17(075.8)

ББК 52.649.222.1я73

Рекомендовано к изданию научно-техническим советом Тольяттинского государственного университета.

ISBN 978-5-8259-0718-5

© ФГБОУ ВПО «Тольяттинский
государственный университет», 2012

ВВЕДЕНИЕ

Методы молекулярной биологии всё шире используются в клинической лабораторной диагностике заболеваний микробной этиологии. Заложенные во второй половине XX столетия основы молекулярной биологии и геномной инженерии привели к созданию методической базы для проведения молекулярно-биологических исследований возбудителей инфекционных болезней. Классические методы генетики, используемые для определения специфических нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК возбудителей путём гибридизационного анализа, не нашли широкого применения в лабораторной диагностической практике. Причина этого прежде всего связана с высокой стоимостью необходимых реагентов и большой трудоёмкостью. Специфичность таких методов зависит от условий постановки реакции, а чувствительность – на уровне общепринятых методов диагностики. Новый этап в молекулярной диагностике инфекционных заболеваний связан с открытием методов амплификации нуклеиновых кислот в условиях *in vitro*, по сути, имитирующих природную возможность репликации нуклеиновых кислот, что позволяет осуществлять многократную амплификацию фрагмента или сигнала в пробирке. На рубеже 90-х годов прошлого столетия был разработан такой метод амплификации нуклеиновых кислот, как *полимеразная цепная реакция*. Это метод, который позволяет найти в исследуемом клиническом материале небольшой участок генетической информации (ДНК/РНК) инфекционного возбудителя, многократно его размножить и выявить с помощью различных современных технологий (гибридизационно-флюоресцентная детекция в режиме «реального времени» и «по конечной точке»).

Принцип метода полимеразной цепной реакции (Polymerase Chain Reaction, PCR) был разработан в 1983 году Кэрри Муллисом, удостоенным за это Нобелевской премии в области химии в 1993 году. Изящность, простота исполнения, непревзойдённые показатели чувствительности и специфичности принесли новому методу небывалую популярность. За короткое время ПЦР-анализ распространился по всему миру, быстро выйдя из лабораторий научных институтов в сферу практического клинического использования, что позволило ему превратиться в «диагностический инструмент нового тысячелетия». На сегодняшний день ПЦР-анализ остаётся наиболее распространённой и динамично развивающейся технологией.

1. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ КАК МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ПЦР – метод молекулярной диагностики, ставший для ряда инфекций «золотым стандартом», проверен временем и тщательно апробирован клинически. Метод ПЦР позволяет определить наличие возбудителя заболевания, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул ДНК возбудителя. ПЦР позволяет диагностировать наличие долго растущих возбудителей, не прибегая к трудоёмким микробиологическим методам, что особенно актуально в гинекологии и урологии при диагностике урогенитальных инфекций и заболеваний, передающихся половым путем (ЗППП).

Также этим методом проводят диагностику вирусных инфекций, таких как гепатиты, ВИЧ и др. Чувствительность метода значительно превосходит таковую у иммунохимических и микробиологических методов, а принцип метода позволяет диагностировать наличие инфекций со значительной антигенной изменчивостью.

Специфичность ПЦР при использовании технологии PCR даже для всех вирусных, хламидийных, микоплазменных, уреаплазменных и большинства других бактериальных инфекций достигает 100%. Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-диагностика обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать невозможно.

Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и скрыто существующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, поскольку этот метод позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях.

1.1. Разновидности и форматы полимеразной цепной реакции

ПЦР с «горячим» стартом (hot-start PCR)

Суть реакции состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих

специфический отжиг, позволяющих уменьшить риск образования неспецифических продуктов амплификации. Самым простым решением этой проблемы является добавление одного из компонентов реакционной смеси (праймера, полимеразы) только после прохождения стадии денатурации. Наряду с этим было разработано два коммерческих подхода, позволяющих так же ингибировать подобную неспецифическую амплификацию. Первый из них подразумевает физическое разделение компонентов реакции (например, при помощи воска, парафина), пока рабочая смесь не достигнет температуры 55–58°C. Второй – использование модифицированных ДНК-полимераз и моноклональных антител к ним: AmpliTaq™plus, TaqStart™Antibody и т. д., с предварительным подогревом рабочей смеси при 80°C в течение 2–10 минут для их активации. Во всех перечисленных случаях, даже если неспецифический отжиг произошёл до начала температурного циклирования, элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются.

Ступенчатая ПЦР

С помощью этого метода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров, приводящего к амплификации неспецифической последовательности ДНК. При постановке данной реакции первые циклы проводят при температуре выше температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру снижают на 1–2°C. При определённой температуре система пройдёт через полосу оптимальной специфичности праймеров к ДНК. Таким образом, удаётся избавиться от несоответствия между рассчитанной температурой плавления праймера и реально оптимальной температурой его отжига.

Мультиплексная (множественная, мультипраймерная) ПЦР

Позволяет осуществлять одномоментную диагностику различных видов возбудителей путём использования нескольких пар праймеров, проводя амплификацию нескольких ДНК-матриц или ДНК-мишеней в одной пробирке. К недостаткам этого метода можно отнести более низкую чувствительность, а также сложность интерпретации результатов анализа клинических образцов. К преимуществам – возможность одновременного определения ДНК нескольких возбудителей в одной ПЦР-реакции, что приводит к снижению количества манипуляций и

себестоимости исследования, увеличивает пропускную способность клинической лаборатории.

Гнездовая («вложенная») ПЦР

Используется для уменьшения числа побочных продуктов реакции, повышения чувствительности и специфичности, благодаря использованию двух пар праймеров, специфичных в отношении ДНК-мишени, и проведению двух последовательных реакций. Недостатком данного метода является более высокий риск контаминации в лаборатории, как следствие, получение ложноположительных результатов; более высокие трудозатраты при постановке реакции. В то же время данная реакция обладает более высокой чувствительностью и специфичностью, за счёт разведения образца происходит снижение концентрации ингибиторов ПЦР при переносе ампликона из одной пробирки в другую.

Инвертированная ПЦР

Используется в том случае, когда известен лишь небольшой фрагмент внутри нужной неизвестной последовательности ДНК, т. е. необходимый для амплификации фрагмент ДНК фланкирует с обоих концов известную последовательность. Известная последовательность ДНК имеет узнаваемый сайт рестрикции для определённой рестриктазы, гидролиз ДНК по данному сайту рестрикции приводит к тому, что фрагменты известной последовательности оказываются на обоих концах неизвестного участка ДНК, после чего можно проводить традиционную ПЦР. Этот метод особенно полезен в молекулярной биологии, когда нужно определить соседние последовательности после вставки фрагмента ДНК в геном и её локализации. Например, различные ретровирусы и транспозоны случайным образом интегрируют в геномную ДНК.

Асимметричная ПЦР (однонаправленная ПЦР)

Используется при необходимости амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК и наработать одноцепочечные фрагменты ДНК-мишени. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берётся или в большом избытке по сравнению со вторым праймером, или используется в отсутствие второго праймера. Быстрое истощение второго праймера в процессе амплификации приводит к тому, что синтез ДНК продолжается только с одного праймера, приводя к линейному накоплению одноцепочечных продуктов амплификации.

ПЦР in situ

Чувствительность ПЦР *in situ* в 10 раз выше, что позволяет обнаруживать одну копию ДНК на фоне 1 мкг неспецифической ДНК. Методика позволяет проводить ПЦР на гистологических срезах тканей (фиксированных препаратах тканей, клеток или хромосом) или монослоях клеток. Внутриклеточное обнаружение продуктов амплификации осуществляют двумя способами: через опосредованную (непрямую) *in situ* гибридизацию или прямую *in situ* детекцию меченых нуклеотидов, которые включаются в состав амплифицируемого продукта в процессе ПЦР.

ПЦР в геле (метод молекулярных колоний)

Акриламидный гель полимеризуют со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

Алель-специфическая ПЦР

Данный метод используют при обнаружении мутаций в геномной ДНК, он позволяет находить небольшое число мутантных ДНК на фоне большого числа молекул дикого типа. Для детекции мутантной ДНК используют аллель-специфические праймеры, полностью комплементарные лишь мутантным последовательностям, что обеспечивает амплификацию только мутантной ДНК, а ДНК дикого типа в реакцию не вступает. Подобный подход позволяет обнаружить несколько десятков или сотен молекул мутантной ДНК на фоне десятков тысяч молекул ДНК дикого типа. ПЦР с аллель-специфическими праймерами является простым и эффективным методом обнаружения мутаций в геномной ДНК обследуемых индивидуумов.

ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (RAPD PCR, ПЦР с произвольными праймерами)

В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (10–15 п. н.) со случайной последовательностью нуклеотидов при низкоспецифических условиях амплификации. Используется как таксономический инструмент, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы, дифференциации штаммов из различных источников и различных субтипов в пределах серотипа и т. д.

ПЦР длинных фрагментов

Метод ПЦР с обратной дот-блот-гибридизационной детекцией на стрипах с иммобилизованными на их ДНК-зондами представляет собой модификацию ПЦР, предназначенную для амплификации протяжённых участков ДНК (10 тысяч оснований и больше). Имеется ряд факторов, ограничивающих в обычных условиях проведение амплификации протяжённых последовательностей ДНК с высокой точностью. Это депуринизация ДНК при высоких температурах, используемых для денатурации ДНК, подавление элонгации растущих цепей ДНК стабильными элементами вторичной структуры амплифицируемых одноцепочечных участков матрицы, слишком короткое время элонгации праймеров в соответствующих сегментах ПЦР или фрагментация матричной ДНК. Частично данные затруднения преодолеваются путём повышения значений pH реакционной смеси при проведении реакции амплификации, что подавляет протонирование пуриновых оснований, которое само по себе ускоряет процесс депуринизации. Данный метод находит применение при обнаружении крупных перестроек геномной ДНК, сопровождающихся экспансией тринуклеотидных повторов, для выявления протяжённых транслокаций, а также для амплификации целых генов, например, гена ретинобластомы, вирусных геномов или токсинов.

Универсальная ПЦР

В данном методе в качестве мишени используются консервативные последовательности ДНК, несущие филогенетическую информацию. Новые или некультивируемые патогенные возбудители могут быть идентифицированы непосредственно из инфицированных тканей человека или крови при использовании этой методики. Универсальная ПЦР позволяет быстро и высокоспецифично проводить идентификацию бактерий с использованием одной пары праймеров, использующих в качестве мишени малую субъединицу 16S рРНК гена. Молекулы 16S рРНК имеют участки консервативных последовательностей, которые содержатся во всех известных эубактериях.

ПЦР с обратной транскрипцией

Используется для амплификации, выделения и идентификации известных последовательностей из рибонуклеиновой кислоты (РНК), позволяет количественно определять их содержание. Вначале прово-

дят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы кДНК с помощью фермента ревертазы (обратной транскриптазы, РНК-зависимой ДНК-полимеразы), которая дальше используется в качестве матрицы для постановки классической ПЦР. Данный метод широко используется для оценки дифференциальной экспрессии генов на уровне транскрипции и в ДНК-диагностике возбудителей инфекционных заболеваний, например, для обнаружения вируса гепатита С или ВИЧ.

Иммуно-ПЦР

Высококочувствительный метод обнаружения белков и антигенов, приводит к 1000-кратному увеличению чувствительности при детекции антигенов по сравнению с обычными методами. В этой группе методик используют ковалентные конъюгаты фрагментов одноцепочечной или двухцепочечной ДНК с антителами или их генно-инженерными производными в качестве зондов к исследуемым антигенам. Антиген, иммобилизованный на твёрдом носителе, инкубируют с антителами в виде конъюгатов с маркерным фрагментом ДНК. После отмывки избытка несвязавшегося конъюгата связавшийся фрагмент ДНК обнаруживают с помощью полимеразной реакции.

ПЦР с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени

Метод основан на количественной флюоресцентно-гибридизационной детекции специфических продуктов амплификации, в которой флюоресцентная репортерная молекула (интеркалирующий двухцепочечную ДНК краситель, флюорофор) используется для наблюдения за развитием реакции амплификации, а увеличение интенсивности репортерной флюоресценции прямо пропорционально увеличению количества ампликонов. При постановке ПЦР в реальном времени флюоресценция положительных образцов увеличивается с каждым циклом амплификации, в то время как отрицательные образцы остаются на уровне базовой флюоресценции.

Точность количественного определения при постановке ПЦР в реальном времени зависит от используемых стандартов, а также от количества копий специфического фрагмента в анализируемом образце. Данный метод имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционной ПЦР. Амплификация и анализ продукта амплификации осуществля-

ются одновременно в процессе реального времени, информация о продукте накапливается во время амплификации (количественный анализ) в одной и той же пробирке и в одном и том же инструменте. Отсутствует необходимость обработки продуктов амплификации после ПЦР, а также необходимость переноса образца, переноса реагентов и проведения электрофореза, как следствие, нет необходимости удалять образец из закрытых пробирок, что ведёт к снижению риска контаминации продуктами амплификации (менее жесткие требования к организации ПЦР-лаборатории), обуславливая высокую производительность реакции и быстрый процесс амплификации.

***Объективность проведённых исследований,
автоматический учёт результатов***

Данная реакция занимает меньше времени, более специфична, чувствительна и воспроизводима, чем традиционная ПЦР. В то же время эта методика не идеальна для мультиплексной ПЦР, её постановка требует довольно высоких технических навыков, высока стоимость оборудования, велик коэффициент вариаций при анализе одних и тех же проб.

1.2. Компоненты полимеразной цепной реакции

Термофильная ДНК-полимераза — фермент, катализирующий синтез новых молекул ДНК. Источником фермента являются бактерии-термофилы, существующие при экстремальных температурах и выделенные впервые из горячих источников (гейзеров). Наиболее распространен фермент Taq-полимераза из *Thermus aquaticus*. Следует подчеркнуть, что термоустойчивость Taq-полимеразы играет принципиальную роль в ПЦР. Первые эксперименты были поставлены Кэри Муллисом с ДНК-полимеразой из кишечной палочки, которая инактивируется при высокой температуре. Тогда после каждого цикла денатурации необходимо было вновь добавлять фермент, что повторялось 35–40 раз и существенно затрудняло постановку реакции. По признанию самого Кэри Муллиса, выход из ситуации ему подсказала публикация российского ученого, в то время аспиранта Института общей генетики доктора А.С. Каледина.

В журнале «Биохимия» автор впервые в мире описал выделение и основные свойства термофильной ДНК-полимеразы из *Thermus*

aquaticus. Из публикации следовало, что оптимальная температура для фермента находится в пределах 65–75°C, и фермент практически не теряет активности при 95°C. Это оказалось решением проблемы: стоило в начале реакции внести 0,5–1 единицу Taq-полимеразы, и она сохраняла высокую активность на протяжении всех циклов амплификации.

В настоящее время используются различные термофильные ДНК-полимеразы, в том числе и модифицированные с помощью методов генетической инженерии. Поиск новых ферментов направлен главным образом на решение двух проблем: улучшение процессивности, т. е. увеличение скорости синтеза ДНК (в среднем скорость составляет 1000 нуклеотидов в минуту) и точности синтеза ДНК.

Праймеры – синтетические одноцепочечные фрагменты ДНК (олигонуклеотиды) средней протяженностью от 20 до 30 звеньев. Праймеры комплементарны определенному локусу генетического материала того или иного возбудителя и, выполняя распознающую роль (как антитела в серологических реакциях), определяют специфичность амплификации. Подбор праймеров осуществляется с помощью компьютерных программ, опирающихся на базу данных о нуклеотидных последовательностях различных микроорганизмов.

Подбор праймеров осуществляется таким образом, чтобы они ограничивали в геноме искомого возбудителя фрагмент ДНК размером 200–100 нуклеотидов и не взаимодействовали с ДНК других возбудителей. Специфичность амплификации во многом определяется температурой отжига, при которой и происходит взаимодействие праймеров с искомой матрицей ДНК. Поэтому компании, производящие диагностические наборы, тщательно проверяют теоретические расчеты эмпирическим путем.

Следует сказать, что при длительном хранении или многократном размораживании наблюдается уменьшение длины праймеров. В результате этого изменяются условия специфического взаимодействия праймеров с ДНК-матрицей, что приводит к некорректным результатам при диагностике. Отметим также, что дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ, которые служат строительным материалом для синтеза новых молекул ДНК, содержатся в реакционной среде в эквимольных количествах. Средняя концентрация трифосфатов составляет 200–400 микромолей.

Тақ-ДНК-полимераза является Mg-зависимым ферментом, поэтому присутствие ионов Mg^{+} в среде обязательно. Обычно концентрация Mg составляет 1,5–3 мм. Трис-НСI, обычно используемый для постановки реакции, создает буферную среду и поддерживает рН в диапазоне 7,0–8,0. Иногда для стабилизации фермента в буфер добавляется бычий сывороточный альбумин или желатин.

1.3. Подготовка проб для исследования методом ПЦР

Подготовка клинического образца для исследования методом ПЦР сводится к освобождению пробы от примесей, способных оказать ингибирующее действие на процесс реакции амплификации. Существует два подхода при обработке проб. Наиболее надежный метод направлен на выделение из образца чистых нуклеиновых кислот за счет их избирательной сорбции.

Такая очистка ДНК достигается на специальных микроколонках или с помощью сорбентов, приготовленных на основе силикагеля. Исключается попадание ингибиторов в реакционную смесь и, следовательно, получение ложноотрицательных результатов, когда отсутствие положительной реакции интерпретируется как отсутствие в пробе искомого возбудителя, хотя истинной причиной отрицательного результата является ингибирование процесса амплификации за счет примесей, внесенных в пробу вместе с образцом ДНК. Тем не менее у метода есть два недостатка:

1. Процедура очистки ДНК достаточно продолжительна, что увеличивает время постановки исследования.
2. В ряде случаев используемые сорбенты не задерживают низкомолекулярные ДНК.

Второй метод подготовки проб состоит в простом лизисе исследуемого материала в сочетании с температурной обработкой. При таком способе проба обрабатывается щелочью с последующей нейтрализацией или низкими концентрациями детергентов, которые не ингибируют активность ДНК-полимеразы. В некоторых случаях достаточно одного кипячения пробы. Недостатком таких подходов является возможность присутствия ингибиторов реакции в пробе, что приводит к ложноотрицательным результатам. Этот метод неприемлем для исследования осадка мочи из-за высокого содержания мочевой кислоты.

2. БАКТЕРИИ РОДА ENTERОБАСТЕР – ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

2.1. Биологические свойства энтеробактеров

Род *Enterobacter* объединяет прямые подвижные палочки размером 1,2–3,0×0,6–1,0 мкм. Единственный неподвижный вид – *E. asburiae*. Факультативные анаэробы, хемоорганотрофы, метаболизм дыхательный и бродильный. Глюкозу сбраживают с образованием кислоты и газа; ферментируют маннит, лактозу, сахарозу, рамнозу, ксилозу, мальтозу, сорбит, арабинозу, рафинозу, вариабельно – инозит, дульцит, салицин и адонит. Индол, H₂S, ДНКазу, фенилаланин, дезаминазу и липазу не образуют. Утилизируют цитрат. Согласно IX изданию «Определителя бактерий Берджи» (1994), род насчитывает 13 видов (*E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. amnigenus* (2 биогруппы), *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. dissolvens*, *E. gergoviae*, *E. hormaechei*, *E. intermedius*, *E. nimipressuralis*, *E. sakazakii*, *E. taylorae*).

Типовой вид – *E. cloacae*. Широко распространены в природе: бактерии выделяют из воды, сточных вод, с растений, из фекалий животных и человека. Доказана патогенность энтеробактеров для некоторых насекомых; в частности, Ф. д'Эрелль (1911) и другие применяли их в качестве возбудителя болезни у саранчи. На протяжении последних 25–30 лет систематика рода претерпела существенные вариации. Исследования генома энтеробактеров, проведённые в последние годы, показали, что значительная часть различных штаммов ими не является. Указанное особенно значимо для изолятов, условно отнесённых в группу *E. agglomerans*.

По результатам гибридизации ДНК внутри вида выделяют 18 групп; 56% из 124 изученных штаммов имеет ДНК, гомологичную энтеробактерам, а 41–47% – бактериям рода *Erwinia*. Изучение 86 клинических изолятов показало, что 60% образуют общий генетический кластер, резко отличающийся от остальных штаммов. Его дальнейшее исследование выявило 92–99% гомологию ДНК с *Erwinia herbicola* и *Erwinia milletiae*. В соответствии с указанным бактерии группы *E. agglomerans* выделены в род *Pantoea*.

Подвижные бактерии в мазках располагаются одиночно, реже – короткими цепочками, некоторые штаммы снабжены капсулой.

На твёрдых средах образуют слизистые и неслизистые колонии, напоминающие колонии клебсиелл и эшерихий. Ферментирующие лактозу штаммы образуют розовые или малиновые колонии на средах Эндо, Плоскирева или Мак-Конки. Не ферментирующие лактозу штаммы образуют желтоватые или бежевые колонии. Вызывают помутнение жидких сред.

Энтеробактеры хорошо растут на простых питательных и селективно-дифференциальных средах. Температурный оптимум 30–37°C, оптимум рН–7,2. У энтеробактеров выделяют О- и Н-Аг; у капсулированных штаммов – также К-Аг, типирование проводят по О-Аг.

2.2. Эпидемиология и патогенез вызываемых заболеваний

Вопрос о патогенности энтеробактеров для человека длительное время оставался открытым, но в 70–80-х годах установлено, что бактерии редко вызывают самостоятельные инфекции, но часто поражают стационарных пациентов, особенно получающих антибиотики широкого спектра действия. В медицинских учреждениях возбудитель может передаваться через руки персонала. В настоящее время энтеробактеры вызывают до 10–15% всех госпитальных инфекций и 5–10% госпитальных бактериемий. Несколько реже бактерии инфицируют ожоговые и хирургические раны, а также вызывают поражения мочеполовой и дыхательной систем. *E. sakazakii* вызывает менингиты и абсцессы ЦНС у новорожденных. Достаточно часто *E. cloacae* и *E. aerogenes* контаминируют различные растворы для внутривенных введений. *Enterobacter aerogenes* обнаруживают при инфекциях мочевыводящих путей и при сепсисе. Все энтеробактеры отличаются высокой устойчивостью к дезинфицирующим средствам.

Из 7 видов энтеробактеров, выделяемых из организма человека (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. sakazakii*, *E. gergoviae*, *E. amnigenus*, *E. taylorae*), поражения наиболее часто вызывают первые два вида. Основные факторы патогенности – микроворсинки, облегчающие колонизацию, и эндотоксин.

1. Установлена способность энтеробактеров агглютинировать *in vitro* эритроциты различных животных, обусловленная манноза-чувствительными и манноза-резистентными микроворсинками (последние выявлены лишь у *E. gergoviae*).

2. Большая часть изолятов *E. cloacae* образует сидерофоргидроксиаматного типа аэробактин, связывающий ионы Fe^{2+} и опосредующий инвазивную активность. Аэробактин не идентичен аналогичному продукту *E. coli*, но антитела к первому перекрёстно реагируют с антигеном второго.

3. Изоляты *E. cloacae*, выделенные при гемолитическом уремическом синдроме, продуцируют шигаподобный токсин, его роль в патогенезе поражений остаётся невыясненной. У этих же штаммов выделен поверхностный белок, ингибирующий систему поринов, что проявляется в снижении чувствительности к β -лактамовым антибиотикам. Также установлена его тождественность белку инвазивности *Yersinia enterocolitica*, сывороточному фактору резистентности и фактору резистентности к внутриклеточным микробицидным механизмам макрофагов *Salmonella typhimurium*.

Информация о конкретных нозологических формах поражений, вызываемых энтеробактерами, крайне скудна. Энтеробактер встречается в толстом кишечнике многих здоровых людей, но он относится к условно-патогенным бактериям, и при попадании энтеробактера в другие органы возможно развитие инфекционных заболеваний. Ряд видов *Enterobacter* (*Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae* и др.) вызывают инфекционные заболевания почек и мочевыводящих путей (острый пиелонефрит, обострение хронического простатита), половых органов, респираторной системы, острые желудочно-кишечные заболевания, гнойничковые поражения кожи, инфекционное воспаление мозговых оболочек, септицемию, внутрибольничные инфекции.

Энтеробактеры выделяются из мочи, кала, крови, мокроты, спинно-мозговой жидкости, плевральной жидкости, с поверхности кожи, из желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы. Тяжелые заболевания у человека могут вызывать почти все представители рода *Enterobacter*.

В последние годы отмечено увеличение частоты выделения энтеробактеров при внутрибольничных инфекциях. Так, при инфекциях мочевыводящих путей частота выделения этих бактерий возросла с 26 до 32%. Описаны случаи внутрибольничных вспышек, поразивших в основном мочевые пути и вызванных *Enterobacter aerogenes* серотипа K2.

2.3. Роль представителей рода *Enterobacter* в развитии заболеваний растений

В связи с широкой распространённостью бактерии рода *Enterobacter* являются постоянными спутниками не только человека, они также выделяются с растений.

Бактерии рода *Enterobacter* считаются условно-патогенными для растений. Они заселяют микрофлору различных частей растений. При изучении ризосферы тыквы были выделены такие виды энтеробактеров, как *E. aerogenes*, *E. intermedius*, *E. gergoviae*, при этом субъективные проявления бактериозов отсутствовали.

Имеются данные, согласно которым *Enterobacter* является патогенными исключительно в культуре *in vitro* (vitroparts). Бактерии могут вызывать быструю гибель пробирочных растений, снижать их способность к микроклональному размножению и хранению или находиться в латентном состоянии, пока не возникнут условия, благоприятные для их интенсивного размножения. Такой вид, как *Pantoea agglomerans* (его образуют бактерии, до 1989 года относимые к *Enterobacter agglomerans*) является постоянной составной частью ризосферной, эпифитной и эндофитной микрофлоры растений и поражает сельскохозяйственные культуры только в комплексе с определенными условиями.

При изучении возбудителей пырея ползучего наиболее часто выделялись *Pantoea syringae* и *P. agglomerans*. Все выделенные фитопатогены, за исключением ряда штаммов *P. agglomerans*, при искусственном заражении вызвали признаки поражения не только пырея ползучего, но и пшеницы, в посевах которой произрастал сорняк. Среди выделенных вирулентных для пырея *P. agglomerans* ряд штаммов не заражал пшеницу. Казалось бы, что среди этой группы штаммов можно было бы отобрать перспективный для разработки биопрепарата в борьбе с пыреем. Однако эти штаммы заражали ряд других сельскохозяйственных растений, в том числе и бобовые (сою, фасоль), которые в севооборотах являются предшественниками пшеницы. При хранении на искусственных средах большинство штаммов *P. agglomerans* быстро теряют способность заражать какие-либо растения.

Одним из наиболее распространённых заболеваний растений, вызываемых энтеробактерами, является мокрая бактериальная гниль.

Возбудителями болезни являются гниlostные грамoтрицательные бактерии *Pantoea agglomerans* (Beijerinck) Gavini et al. (син. *Enterobacter herbicola* (Luhnis) Dye).

Поражается лук первого года выращивания, особенно во время хранения луковиц. Наносится значительный ущерб и семенникам во время их вегетации в поле. Заболевание начинается, как правило, еще в поле – в конце вегетации, но массового развития достигает в период хранения. У пораженных луковиц вокруг стеблевого конца образуется большое светлое или чуть розоватое пятно. Ткань в месте пятна размягчается и приобретает такой вид, будто она насыщена водой. Более четкие признаки болезни, особенно в начале развития, можно обнаружить только на продольном разрезе луковицы. Под здоровыми наружными чешуями обнаруживается слой из одной-двух размягченных, как бы запаренных и ослизненных чешуй, имеющих желто-бурую окраску. Иногда чередование здоровых и больных чешуй наблюдается и в более глубоких внутренних частях луковицы. Со временем, обычно через 2–3 месяца после уборки, поражением может быть охвачена вся луковица. Сначала шейка, а затем и вся ткань ее размягчается и ослизняется, луковица сгнивает и издает неприятный запах.

Кроме лука бактерии поражают многие виды овощных культур (морковь, сельдерей, репу, разные виды капуст, томат, перец, огурец, дыню, салат, редьку, спаржу, пастернак, фасоль), а также табак, цикорий, пеларгонию, орхидею и др. Внешние симптомы бактериальной гнили проявляются на простых луковицах (зубках) чеснока в период хранения сначала в виде углубленных коричневых язвочек, штрихов или полос, идущих от донца вверх.

Ткани пораженного зубка приобретают перламутрово-желтую окраску, становятся как бы подмороженными или вареными. Позже инфицированная ткань загнивает, ослизняется. Постепенно все содержимое сложной луковицы (головки) чеснока разлагается в виде светло-бурой слизи и издает типичный гниlostный запах.

Бактерии проникают в растение еще в поле через различные ранения, в первую очередь в местах повреждения насекомыми. Ткани в этих местах размягчаются и мацерируются вследствие растворения межклеточной пластинки ферментом протопектиназой, выделяемой бактериями. Во время хранения пораженных луковиц мокрая гниль рас-

пространяется на соседние луковицы и вызывает их загнивание. Очаги бактериальной гнили могут быстро разрастаться и вызвать загнивание огромной партии луковиц, заложенных на хранение.

Причинами, предрасполагающими к поражению лука и чеснока мокрой бактериальной гнилью, могут быть солнечные ожоги тканей или повреждения их в период ухода за растениями и уборки, а также другие причины, приводящие к физиологическому ослаблению тканей.

Резкая смена погодных условий при созревании лука и чеснока (от влажной с умеренными температурами к сухой и жаркой) способствует развитию болезни, так как в результате происходит быстрое засыхание зеленых листьев. Одной из причин загнивания сочных чешуй лука и зубков чеснока может быть резкое нарушение обмена веществ у растений. Мокрой бактериальной гнилью в первую очередь поражаются плохо вызревшие сложные луковицы чеснока и плохо просушенные. Хранение лука и чеснока при повышенных температурах и влажности усиливает развитие гнили и может привести к повторному распространению инфекции.

Внесение сбалансированных доз минеральных удобрений с превышением расчетной нормы фосфорных на 15–20% непосредственно под лук и чеснок существенно повышает устойчивость растений к мокрой бактериальной гнили и другим заболеваниям, способствует повышению урожайности культур, улучшает качество продукции.

Для ликвидации источников первичной инфекции на луке первого года и семенниках необходимо своевременно удалять из посевов выявленные одиночные больные растения вместе с луковицами.

Такой вид, как *Enterobacter cloacae* поражает лук, вызывая внутреннюю бактериальную гниль. Болезнь отмечена на зрелых луковицах в полевых условиях после того, как в течение определенного периода температура воздуха достигала уровня 40–45°C. Данная фитопатогенная бактерия распространена во многих типах условий окружающей среды и считается условным патогеном для лука. Внешняя поверхность луковицы остается бессимптомной, тогда как у внутренних чешуек наблюдается изменение окраски на коричневую до черной и загнивание. Меры борьбы с данной болезнью неизвестны.

Однако известны некоторые штаммы (например, *Enterobacter agglomerans* IC1270), которые обладают антагонистическим действием

на патогенные грибы и бактерии и входят в состав биологических препаратов для борьбы с фитопатогенами.

Таким образом, можно отметить растущую роль энтеробактера как опасного возбудителя различных инфекций, поражающих как человека и животных, так и растения.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *ENTEROBACTER* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Быстрое определение видовой принадлежности возбудителей инфекций и их чувствительности к антибактериальным препаратам зачастую является вопросом жизни и смерти пациентов. Методы, используемые для этого в рутинной практике, варьируют в зависимости от оснащённости клинических лабораторий и подготовленности персонала – от микробиологических, в разной степени автоматизированных, до молекулярно-биологических. Наиболее перспективными с точки зрения скорости и точности получаемого ответа являются разные варианты скрининга, основанного на амплификации ДНК с помощью специфичных праймеров, особенно полимеразная цепная реакция (ПЦР), в стандартном режиме и в режиме реального времени (Fluit et al., 2001).

3.1. Идентификация энтеробактеров методом ПЦР

ПЦР для выявления ДНК бактерий рода *Enterobacter* осуществляется с использованием наборов реагентов, обеспечивающих постановку любого из двух вариантов гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации – по конечной точке (вариант FEP) и в режиме реального времени (вариант FRT).

Постановка ПЦР для выявления ДНК изучаемых бактерий осуществляется по схемам и алгоритмам, рекомендованным производителем комплектов реагентов, с обязательным применением внутренних контрольных образцов с этапа экстракции ДНК.

Для оценки жизнеспособности микроорганизмов может применяться ПЦР только в формате детекции продуктов амплификации в режиме реального времени (FRT).

Наиболее часто используемыми генами для ПЦР-идентификации, например, такого вида, как *Enterobacter sakazakii*, являются гены 16srDNA, ompA, dnaG, gluA.

3.2. ПЦР-детекция генов антибиотикоустойчивости

Методом ПЦР в геномах клинических изолятов показано наличие генов бета-лактамаз, принадлежащих к разным типам ферментов: TEM, SHV, CTX M, OXA и AmpC (табл. 1). Наибольшее распространение у *Enterobacter* spp. получили гены blaCTX-M.

Некоторые представители семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*) несут по одному из генов бета-лактамаз, но большинство имеет одновременно два или три гена в разных сочетаниях. Наиболее распространенными комбинациями генов для *Enterobacter* spp. были blaTEM и blaTEM+blaCTX-M.

Таблица 1

Гены бета-лактамаз в геномах *Enterobacter* spp.,
выделенных в 2003–2007 гг.

Гены bla, кодирующие бета-лактамазы	Гены бета-лактамаз в геномах энтеробактерий, выделенных при исследовании в 2003–2007 гг.	
	2003–2004 n=77	2005–2007 n=97
TEM	12 (16)	22 (23)
SHV	6 (8)	3 (3)
CTX-M	7 (9)	5 (5)
TEM+SHV	10 (13)	11 (11)
TEM+CTX-M	20 (26)	13 (13)
SHV+CTX-M	2 (3)	5 (5)
TEM+SHV+CTX-M	2 (3)	14 (14)
Нет генов	20 (26)	24 (25)
Всего TEM	44 (57)	60 (62)
Всего SHV	18 (23)	33 (34)
Всего CTX-M	29 (38)	37 (38)
Всего AmpC	0	13
MIR	0	11
MOX	0	1
LAT	0	1

Интересно отметить, что 26 изолятов (6%) в первой коллекции и 30 изолятов (7%) второй коллекции, большинство из которых являлись *Enterobacter* spp., не имели ни одного из тестируемых генов бета-лактамаз. Очевидно, что устойчивость энтеробактеров к бета-лактамам обеспечивается какими-то другими молекулярными механизмами, нежели наличие бета-лактамаз. По литературным данным, это могут быть эф-

флюксные системы, снижение проницаемости мембран за счет мутаций в генах пориновых белков или наличие индуцибельных ферментов Amp^C-типа (F. Fernández-Cuenca, 2006).

Таким образом, с помощью ПЦР-детекции генов показано, что основным молекулярным механизмом устойчивости к цефалоспорином III–IV поколений у изученных штаммов энтеробактеров является наличие генов бета-лактамаз CTX-M-типа.

3.3. Идентификация генов резистентности, локализованных в интегронах

С помощью ПЦР показано, что изученные клинические изоляты имеют детерминанты устойчивости не только к бета-лактамам, но и к аминогликозидам (гены аденилилтрансфераза *adA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadB*; аминогликозидацетилтрансфераза *acA4*, *aac(6')-Ib*), сульфаниламидам (гены дигидрофолатредуктаз *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA12*, *dfrA17*), хлорамфениколу (ген протонного эффлюксного насоса *cmlA1* и хлорамфеникол-ацетилтрансферазы *catB8*), эритромицину (ген эритромицин-эстеразы *ereA2*) и стрептотрицину (ген стрептотрицинацетилазы *sat1*) – в виде генетических кассет в составе интегронных вставок (рис. 1).

3.4. Изучение конъюгативных плазмид, несущих гены устойчивости

Конъюгативный перенос генов *bla*CTX-M из клеток изучаемых клинических штаммов энтеробактеров в лабораторный реципиентный штамм *E. coli* C600 (*Rif*^R*Az*^R) был успешно осуществлен для 12% *Enterobacter* spp. Отмечено, что перенос генов кластера *bla*CTX-M-1 в большинстве случаев происходил на одном репликоне с генами *bla*TEM. Напротив, перенос генов кластера *bla*CTX-M-9 чаще всего происходил отдельно от генов *bla*TEM.

С помощью Саузерн-гибридизации со специфичным ДНК-зондом показано, что в большинстве клинических изолятов гены *bla*CTX-M и интегроны класса 1 локализованы на высокомолекулярных плаزمидах (>80 т. п. н.). На описанных конъюгативных плаزمидах локализованы также гены, кодирующие бета-лактамазы TEM-типа (13% изолятов).

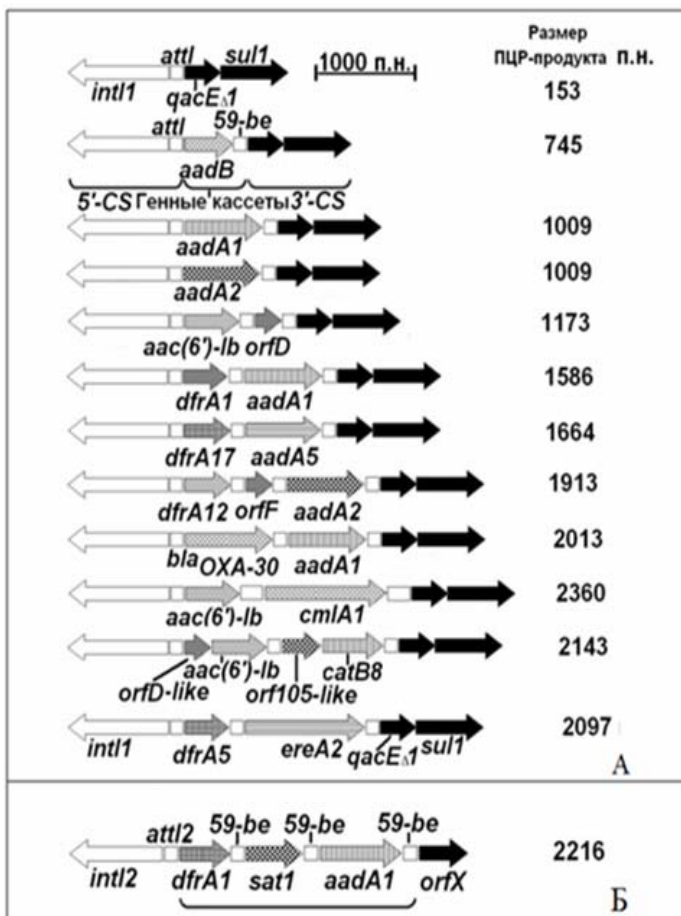


Рис. 1. Структура интегронных вставок класса 1 (А) и класса 2 (Б)

ПЦР-типирование плазмид по группам несовместимости Inc показало, что конъюгативные плазмиды, присутствующие в клинических изолятах *Enterobacter* spp. преимущественно принадлежат к группам несовместимости IncFIB, IncL/M и IncA/C (рис. 2).

Приведённые данные показывают, что гены резистентности к бета-лактамам антибиотикам и антибактериальным средствам других функциональных классов в нозокомиальных штаммах энтеробактеров локализованы на конъюгативных плаزمидах, что обеспечивает их

горизонтальное распространение между бактериями. Подтверждается отмеченная ранее важная роль конъюгативных плазмид в распространении генов лекарственной устойчивости.

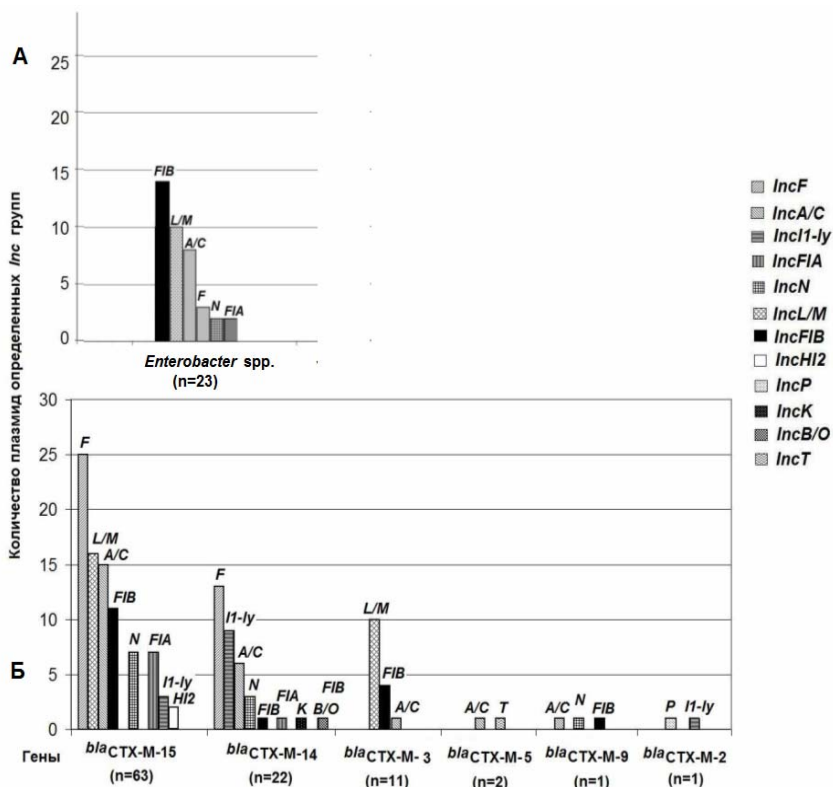


Рис. 2. Inc-группы конъюгативных плазмид *Enterobacter* spp. (А); Inc группы плазмид, на которых локализованы гены *bla*CTX-M (Б)

Таким образом, устойчивость изученных штаммов к бета-лактамам (пенициллинам и цефалоспорином) определяется наличием генов бета-лактамаз TEM-, SHV-, OXA-, AmpC- и CTX-M-типов, присутствующих в геномах преимущественно по два или три гена в разных сочетаниях. В геномах 23% штаммов *Enterobacter* spp. зафиксировано появление сравнительно нового механизма устойчивости к хинолонам – плазмидно-кодируемых генов *qnrB2*, *qnrB4* и *qnrS*.

Исходя из вышесказанного можно сделать следующие выводы.

1. Устойчивость изученных штаммов *Enterobacter* к бета-лактамам антибиотикам определяется наличием генов бета-лактамаз TEM-, SHV-, OXA-, AmpC- и CTX-M типов, присутствующих в геномах преимущественно по два или три гена в разных сочетаниях.

2. Гены blaCTX-M – превалирующие детерминанты устойчивости к бета-лактамам – локализованы преимущественно на высокомолекулярных плазидах (>80 т. п. н.), имеющих гибридную природу и относящихся к группам несовместимости IncF, IncA/C, Inc L/M.

3. Интегроны классов 1 и 2 играют важную роль в формировании антибиотикоустойчивости к аминогликозидам, хлорамфениколу, эритромицину, сульфаниламидам и др. препаратам у значительной части госпитальных штаммов энтеробактеров.

4. Устойчивость к хинолонам у 23% штаммов *Enterobacter* spp. определяется наличием плазмидных генов qnr, сравнительно новым молекулярным механизмом устойчивости к данному классу препаратов.

5. Перечень генетических маркеров для ПЦР-детекции генов резистентности, включающий детерминанты устойчивости к бета-лактамам, к аминогликозидам, к сульфаниламидам, к хинолонам, к другим антибактериальным препаратам, может обеспечить информативную генетическую характеристику госпитальных штаммов *Enterobacter*.

3.5. Использование ПЦР для исследования β-лактамаз, продуцируемых энтеробактерами

ПЦР является одним из наиболее практически значимых молекулярно-диагностических методов, который широко используется для выявления и исследования различных детерминант устойчивости к антибиотикам у клинических штаммов микроорганизмов, включая гены β-лактамаз.

Бета-лактамазы представляют обширную группу генетически и функционально различных ферментов, отличающихся способностью разрушать β-лактамные антибиотики, тем самым обеспечивая устойчивость к ним бактерий-продуцентов. Природная способность к продукции β-лактамаз характерна для многих видов микроорганизмов, в частности для энтеробактеров.

В качестве самостоятельного диагностического метода ПЦР, как и гибридизация, может быть использована для выявления известных β -лактамаз, относящихся к определенной генетической группе. Благодаря преимуществу в чувствительности ПЦР в некоторых случаях позволяет установить наличие исследуемых бактерий, продуцирующих β -лактамазы, непосредственно в клинических образцах без предварительного культивирования.

Бета-лактамазы СТХ-М-типа эффективно гидролизуют многие оксиимино-бета-лактамы (цефотаксим, цефтриаксон, азтреонам), проявляя наибольшую активность в отношении цефотаксима (МПК продуцентов 16–512 мг/л) и значительно меньшую – в отношении цефтазидима (МПК продуцентов 0,5–16 мг/л), хорошо ингибируются тазобактамом и, в меньшей степени, клавулановой кислотой. Выраженная устойчивость к цефотаксиму вследствие продукции СТХ-М β -лактамаз может быть легко обнаружена с помощью фенотипических тестов, однако точная диагностика СТХ-М может быть осуществлена только с помощью молекулярно-генетических методов.

Ферменты этой группы характеризуются значительной (до 30%) вариабельностью нуклеотидных последовательностей кодирующих генов, что затрудняет их диагностику с помощью молекулярно-генетических методов. Анализ кодирующих последовательностей позволяет выделить 4 субтипа СТХ-М, из которых 3 основных – родственные СТХ-М-1 (MEN-1), СТХ-М-2 и СТХ-М-9, соответственно. ПЦР даёт возможность одновременного выявления всех ферментов данной группы за счет ПЦР-амплификации кодирующих генов с праймерами, универсальными для различных генетических субтипов СТХ-М.

Оценка размеров амплификационных фрагментов ДНК и продуктов их рестрикции проводится путем сравнения их электрофоретической подвижности с подвижностью маркерных фрагментов ДНК. Ожидаемый размер амплификационных фрагментов *bla*СТХ-М генов – 543 п. н. На рис. 3 представлены результаты анализа цефотаксим-резистентных клинических изолятов *Enterobacter* spp. и контрольных штаммов.

На основании результатов рестрикционного анализа выявленные гены СТХ-М β -лактамаз могут быть отнесены к одному из 4 субтипов (табл. 2).

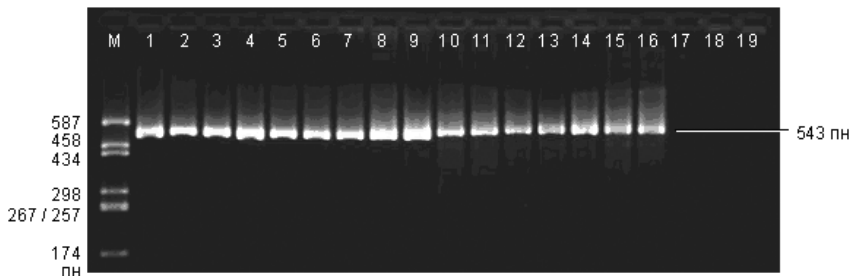
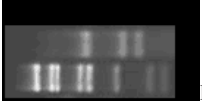
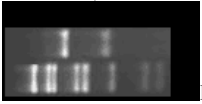
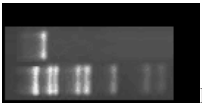
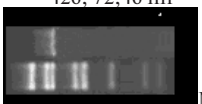
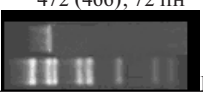


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации blaCTX-M генов:
 М – маркер молекулярной массы (pUC18-HaeIII);
 1–13 – CTX-M-продуцирующие клинические изоляты *Enterobacter* spp.;
 14 – *E. coli* TOP10 (CTX-M-4); 15 – *C. freundii* 2525 (CTX-M-3);
 16 – *K. ascorbata* T861; 17 – *S. typhimurium*; 18 – *E. coli* C600 (TEM-3);
 19 – *K. pneumoniae* (SHV-1, SHV-2)

Таблица 2

Дифференциация основных субтипов CTX-M
 на основании ПДРФ-анализа

Субтип	Количество сайтов рестрикции		Pst I – Pvu II рестрикционные фрагменты
	Pst I	PvuII	
CTX-M-1: CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, УОЕ-1	0	2	267,156,121 пп  М
CTX-M-2: CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, Toho-1, KluA	1	0	355,188 пп  М
CTX-M-8	0	0	544 пп  М
CTX-M-9: CTX-M-9, -13, -16	1	1	426, 72,46 пп  М
CTX-M-14, -15, -17, -18, -19, -21, Toho-2	0	1	472 (466), 72 пп  М

Для большинства видов семейства Enterobacteriaceae положительный или отрицательный результат амплификации не имеет принципиального диагностического значения в связи с разнообразием продуцируемых энтеробактерами β -лактамаз, различия между которыми в большей степени влияют на характер устойчивости к β -лактамным антибиотикам.

Необходимость дифференциации генов β -лактамаз, отличающихся спектром мутаций, требует привлечения дополнительных методов анализа соответствующих ПЦР-продуктов.

Библиографический список

1. Аленушкина, А.В. Медицинская микробиология / А.В. Аленушкина. – Ростов н/Д : Феникс, 2003. – 480 с.
2. Ассонов, Н.Р. Микробиология / Н.Р. Ассонов. – М. : Колос : Колос-Пресс, 2002. – 351 с.
3. Ахтариева, А.А. Иммунобиологические свойства термолabileного энтеротоксина бактерий рода *Enterobacter* в системе взаимодействия «патоген-хозяин» : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 03.02.03 / Айгуль Атласовна Ахтариева. – Челябинск : Челябинская государственная медицинская академия Росздрава, 2010. – С. 9, 25–27, 37.
4. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология : учебник / Л.Б. Борисов. – М. : Медицинское информационное агентство, 2005. – 736 с.
5. Генетическая инженерия : учеб. пособие / С.Н. Щелкунов. – 2-е изд., испр. и доп. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.
6. Каледин, А.С. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus aquaticus* УТ-1 / А.С. Каледин, А.Г. Слюсаренко, С.И. Городецкий // Биохимия. – 1980. – Т. 45. – Вып. 4. – С. 64.
7. Кулбужева А.А. Типирование бактерий рода *Enterobacter* : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03 / Асет Абасовна Кулбужева. – Нальчик : Кабардино-Балкарский государственный университет, 1999. – С. 3.
8. Лысак, В.В. Микробиология / В.В. Лысак. – Минск : БГУ, 2007. – 429 с.
9. Маянский, А.Н. Патологическая микробиология / А.Н. Маянский. – Н. Новгород : Изд-во НГМА, 2006. – 520 с.
10. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / под ред. А.А. Воробьева. – М. : Медицинское информационное агентство, 2006. – 702 с.
11. Момыналиев, К.Т. Перспективы применения методов ДНК-диагностики в лабораторной службе / К.Т. Момыналиев, В.М. Говорун // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – Ч. 1. – № 4. – С. 25–33.
12. Основы медицинской бактериологии, вирусологии и иммунологии / под ред. Г.М. Шуба. – М. : Логос, 2001. – 264 с.

13. Поздеев, О.К. Медицинская микробиология : учеб. пособие / О.К. Поздеев ; под ред. В.И. Покровского. – М. : ГЭОТАР-Мед, 2001. – 765 с.
14. Полонская, Н.Ю. Основы цитологической диагностики и микроскопическая техника / Н.Ю. Полонская. – М. : Академия, 2005. – 160 с.
15. Прямчук, С.Д. Идентификация специфичных маркеров для характеристики множественно-устойчивых госпитальных штаммов Enterobacteriaceae : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03; 03.02.07 / С.Д. Прямчук. – Оболенск : Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, 2011. – С. 12, 13, 16, 17, 19.
16. Пыльцев, М.А. Введение в молекулярную медицину / М.А. Пыльцев. – М. : Медицина, 2004. – 496 с.
17. Эйдельштейн, М.В. β -Лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования / М.В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3. – № 3. – С. 223–242.
18. Молекулярно-генетический метод выявления резистентности к цефалоспорином у бактерий семейства Enterobacteriaceae, обусловленной продукцией β -лактамаз расширенного спектра стх-м-типа : метод. рекомендации / сост. М.В. Эйдельштейн, М.А. Пимкин. – Смоленск, 2001. – С. 2–5.
19. Mullis, K.B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. Method Enzymol / K.B. Mullis, F.A. Faloona. – 1987. – P. 155, 335.
20. Mullis, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction Sci. Am., 1990. – P. 262.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ КАК МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	4
1.1. Разновидности и форматы полимеразной цепной реакции	4
1.2. Компоненты полимеразной цепной реакции.....	10
1.3. Подготовка проб для исследования методом ПЦР.....	12
2. БАКТЕРИИ РОДА ENTEROBACTER – ВОЗБУДИТЕЛИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	13
2.1. Биологические свойства энтеробактеров.....	13
2.2. Эпидемиология и патогенез вызываемых заболеваний.....	14
2.3. Роль представителей рода <i>Enterobacter</i> в развитии заболеваний растений.....	16
3. ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА <i>ENTEROBACTER</i> МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ	20
3.1. Идентификация энтеробактеров методом ПЦР.....	20
3.2. ПЦР-детекция генов антибиотикоустойчивости.....	21
3.3. Идентификация генов резистентности, локализованных в интегронах.....	22
3.4. Изучение конъюгативных плазмид, несущих гены устойчивости.....	22
3.5. Использование ПЦР для исследования β -лактамаз, продуцируемых энтеробактерами.....	25
Библиографический список.....	29

Учебное издание

Потатуркина-Нестерова Наталия Иосифовна

Немова Ирина Сергеевна

Артамонова Марина Николаевна

Беззубенкова Ольга Евгеньевна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ
МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
РОДА *ENTEROBACTER*

Учебно-методическое пособие

Редактор *О.И. Елисеева*

Технический редактор *З.М. Малявина*

Вёрстка: *Л.В. Сызганцева*

Дизайн обложки: *Г.В. Карасева*

Подписано в печать 29.12.2012. Формат 60×84/16.

Печать оперативная. Усл. п. л. 1,86.

Тираж 500 экз. Заказ № 1-89-12.

Издательство Тольяттинского государственного университета
445667, г. Тольятти, ул. Белорусская, 14

