

# БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2017 • ТОМ 2 • №1

ISSN 2500-1027

# БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

## Главный редактор

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

## Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.  
(Россия)

## Редакционный совет

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

## Редколлегия

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

## Учредитель

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

### Адрес учредителя и редакции:

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

### Издатель

© «Издательство «Династия»



[www.phdynasty.ru](http://www.phdynasty.ru)

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

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

## От главного редактора

О необходимости исследования поведения бактерий на популяционном уровне . . . . .	5
---	---

## Микробиология

Оценка эффективности эндодонтической дезинфекции корневых каналов зуба с применением сканирующей электронной микроскопии микробной биопленки <i>В.Н.Царёв, М.С.Подпорин, Е.В.Ипполитов</i> . . . . .	6
---	---

Желудочная микробиота при морфологических изменениях гастродуоденального тракта, ассоциированных с инфекцией <i>Helicobacter pylori</i> <i>Г.Ш.Исаева, Л.В.Вакатова, Н.Г.Ефимова, Р.Р.Бурханов, И.Р.Валиуллина</i> . . . . .	14
---	----

Комплексные лабораторные исследования на дифтерию на современном этапе <i>Л.А.Краева, Е.А.Алексеева, Г.И.Беспалова</i> . . . . .	20
---	----

Лекарственно-устойчивый туберкулез: перспективы ускоренной диагностики и химиотерапии <i>Л.Н.Черноусова, С.Н.Андреевская, Т.Г.Смирнова, Е.Е.Ларионова, О.И.Ивахненко, Е.А.Новоселова, Н.А.Шевкун</i> . . . . .	25
---	----

Генотипирование и оценка вирулентности на мышинной модели штамма <i>Mycobacterium tuberculosis</i> с широкой лекарственной устойчивостью, выделенного в Российской Федерации <i>И.А.Дятлов, В.Д.Потапов, Т.И.Комбарова, М.В.Фурсов, А.Г.Богун, Т.Н.Мухина, А.А.Кисличкина, Л.А.Кадникова, С.А.Благодатских, Е.А.Ганина, Т.П.Морозова, Л.В.Домотенко, К.В.Детушев, М.В.Храмов</i> . . . . .	35
---	----

Дифференциация шести видов листерий с помощью ПЦР-ПДРФ анализа ITS-последовательностей, локализованных между генами 16S и 23S рРНК <i>Э.А.Светоч, Е.И.Асташкин, В.Н.Борзенков, О.И.Тазина, Н.Н.Карцев, Н.Р.Ефимочкина, И.П.Мицевич, Н.К.Фурсова</i> . . . . .	46
--	----

Определение специфической активности питательных сред для <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>А.П.Шепелин, А.Б.Сергеева, О.В.Полосенко</i> . . . . .	54
--	----

Антимикробная активность ниосомального геля с доксорубицином в комплексном лечении меланомы челюстно-лицевой области <i>И.А.Базиков, А.Н.Мальцев, В.А.Зеленский, В.И.Королькова, Н.И.Калинкина, Е.А.Гоптарева</i> . . . . .	61
--	----

Обратимость микробиологически индуцированной коррозии под воздействием изменения условий окружающей среды <i>В.Б.Родин, С.К.Жиглецова, Н.А.Акимова, В.П.Холоденко</i> . . . . .	66
--	----

Оценка лечебно-профилактической эффективности бактериофага <i>Klebsiella pneumoniae</i> vB_KpnP_KpV289 на модели острого сепсиса у мышей <i>А.И.Борзилов, В.П.Мякина, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, В.М.Красильникова, В.В.Веревкин, Н.В.Воложанцев</i> . . . . .	73
---	----

Правила для авторов . . . . .	78
-------------------------------	----

# BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

## Editor-in-Chief

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

## Executive Secretary

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

---

## Editorial Council

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

---

## Editorial Board

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

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

---

## Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

---

### Editorial Office:

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

### Publisher

© «Dynasty» Publishing House



www.phdynasty.ru

Advertising Department:

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

---

## Editor-in-Chief's Introduction

On the need to study the behavior of bacteria at the population level . . . . .	5
---	---

---

## Microbiology

Evaluating of the effectiveness of endodontic disinfection of root channels by using scanning electron microscopy of microbial biofilms <i>V.N.Tsarev, M.S.Podporin, E.V.Ippolitov</i> . . . . .	6
Gastric microbiota at gastroduodenal tract morphological changes associated with the infection caused by <i>Helicobacter pylori</i> <i>G.S.Isaeva, L.V.Vakatova, N.G.Efimova, R.R.Burkhanov, I.R.Valiullina</i> . . . . .	14
Comprehensive laboratory studies of diphtheria at the present time <i>L.A.Kraeva, E.A.Alekseeva, G.I.Bespalova</i> . . . . .	20
Drug-resistant tuberculosis: the prospects for accelerated diagnostics and chemotherapy <i>L.N.Chernousova, S.N.Andreevskaya, T.G.Smirnova, E.E.Larionova, O.I.Ivakhnenko, E.A.Novoselova, N.A.Shevkun</i> . . . . .	25
Genotyping and assessment of virulence on a mouse model of highly drug-resistant strain <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolated in the Russian Federation <i>I.A.Dyatlov, V.D.Potapov, T.I.Kombarova, M.V.Fursov, A.G.Bogun, T.N.Mukhina, A.A.Kislichkina, L.A.Kadnikova, S.A.Blagodatskikh, E.A.Ganina, T.P.Morozova, L.V.Domotenko, K.V.Detushev, M.V.Khramov</i> . . . . .	35
Differentiation of six <i>Listeria</i> species using the PCR-RFLP analysis of DNA sequences located between 16S and 23S ribosomal RNA genes <i>E.A.Svetoch, E.I.Astashkin, V.N.Borzenkov, O.I.Tazina, N.N.Kartsev, N.R.Efimochkina, I.P.Mitsevich, N.K.Fursova</i> . . . . .	46
Determination of nutrient medium specific activity for <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>A.P.Shepelin, A.B.Sergeeva, O.V.Polosenko</i> . . . . .	54
Antimicrobial activity of niosomal gel with doxorubicin in complex treatment of melanoma <i>I.A.Bazikov, A.N.Maltsev, V.A.Zelensky, V.I.Korol'kova, N.I.Kalinkina, E.A.Goptareva</i> . . . . .	61
The reversibility of microbiologically induced corrosion under the influence of the change of environmental conditions <i>V.B.Rodin, S.K.Zhigletsova, N.A.Akimova, V.P.Kholodenko</i> . . . . .	66
Evaluation of preventive and therapeutic efficacy of <i>Klebsiella pneumoniae</i> bacteriophage vB_KpnP_KpV289 on the model of acute sepsis in mice <i>A.I.Borzilov, V.P.Myakinina, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, V.M.Krasilnikova, V.V.Verevkin, N.V.Volozhantsev</i> . . . . .	73
Instructions for Authors . . . . .	78

## О необходимости исследования поведения бактерий на популяционном уровне

Достижения в молекулярно-генетических исследованиях последних лет позволили оценить влияние генома на рост и биосинтез важных метаболитов бактериальными клетками, выявить особенности функционирования в зависимости от внешних условий. Это сказалось на интенсивности исследований поведения бактерий на популяционном уровне, от которого во многом зависит возможность выживания, адаптации и реализации полезных и вредных для человека свойств бактерий. Еще в 70-е годы прошлого века предпринимались попытки сформулировать новое направление исследования микробных популяций – «этологию бактерий» (С.Г.Смирнов), термин, обычно применяемый для изучения поведения организмов высших таксонов. В настоящий период развития бактериологии, с использованием большого массива новых знаний о физиологических свойствах и функционировании генома, уже на новом уровне следует интенсифицировать исследования в данном направлении.

Накопившиеся в последнее десятилетие данные о влиянии микробиома человека на развитие и функционирование у него различных систем и органов заставляют более детально исследовать роль отдельных видов, а также совокупности видов бактерий и вирусов (бактериофагов) в возникновении и развитии соматических заболеваний. Наиболее ярким примером является установленная взаимосвязь между микроорганизмами кишечника и мозгом, роли бактерий в развитии нервной системы при росте организма, влиянии на процессы памяти, развитии центральной нервной системы через гормоноподобные метаболиты, нейромедиаторы или влияние на клетки иммунной системы.

В этой связи, изучение влияния популяций патогенных бактерий, способствующих развитию дисбиоза в кишечнике на формирование различных органов и систем, особенно детей, позволяет искать подходы к вопросам профилактики и лечения целого ряда заболеваний на основе данных системных исследований.

Интенсивное развитие методологии полногеномного секвенирования позволяет осуществлять метагеномный анализ микробиома кишечника с определением видового состава, в том числе некультивируемых форм, выявлять патогенные бактерии и наличие у них факторов вирулентности и резистентности. Это, в сочетании с протеомным анализом, позволяет выявлять молекулярные механизмы, регулирующие взаимоотношения в сообществе бактерий.

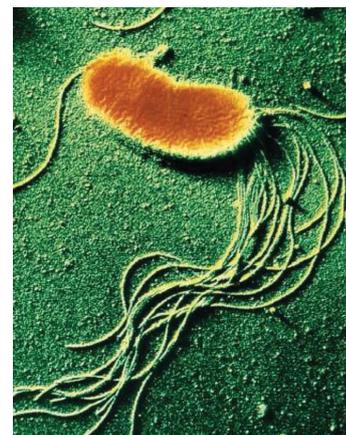
Исследования поведения микробных сообществ именно на популяционном уровне, с учетом их фенотипической и генотипической гетерогенности, пока возможно только в искусственных условиях, но которые, по возможности, должны быть приближены к естественным. Необходимо оценить весь спектр взаимоотношений клеток в микробной популяции через метаболиты и прямые контакты, что позволит в дальнейшем выявлять тонкие механизмы влияния микробных метаболитов на физиологические функции макроорганизма.

Особый интерес представляет социальное поведение микробных популяций, при котором в определенных условиях часть клеток может синтезировать жгутики, собираться в ассоциации, реализовывать принцип quorum sensing (чувство кворума) на основе химических сигналов, что регулирует поведение бактерий. Некоторые бактерии могут образовывать многоклеточные агрегативные структуры для осуществления ряда функций. Последнее наиболее выражено у патогенов, например, шигатоксинпродуцирующих *E.coli*, реализующих принцип агрегативности на энтероцитах кишечника, обеспечивая «впрыск» в макроорганизм токсина, накопленного между клетками.

Социальное поведение микробных популяций патогенов может быть использовано для борьбы с поли- и панрезистентными культурами, когда блокирование коммуникаций между клетками микробного сообщества приводит к медленной выработке или отсутствию резистентности, так как клетка не закрепляет данное свойство в потомстве (эволюционный принцип: если мишень лекарственного средства – общественный продукт, то резистентность не возникает). Примером являются сидерофоры, которые используются многократно всей популяцией, например, *P. aeruginosa* для адсорбции железа; замена их на аналогичное, но не функциональное вещество приводит к гибели популяции.

Для изучения патогенов, учитывая возрастающую проблему лекарственной устойчивости, несомненно важна оценка популяционной структуры бактерий по признакам резистентности и толерантности (дормантные формы) к антимикробным веществам, что позволит подойти к методам борьбы с устойчивостью и персистенцией с новых позиций.

Весь спектр взаимоотношений в микробной популяции даже одного вида бактерий, значимых в медицине, экологии или биотехнологии, требует глубокого анализа с использованием современного арсенала геномных, протеомных, метаболомных, транскриптомных методов исследования и применения математического моделирования. Только в этом случае можно получить новые системные фундаментальные знания о поведении микробных популяций, оценить роль гетерогенности в специализации отдельных групп клеток и использовать эти данные для практических целей. Накопление сведений о поведении микробных популяций позволит со временем перейти к детальному анализу взаимоотношений микромира с макроорганизмом, как единой взаимодействующей симбиотической и синтрофической системы.



www.scienceclarified.com

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

# Оценка эффективности эндодонтической дезинфекции корневых каналов зуба с применением сканирующей электронной микроскопии микробной биопленки

В.Н.Царёв, М.С.Подпорин, Е.В.Ипполитов

ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»,  
Москва, Российская Федерация

Частота осложнений по результатам эндодонтического лечения хронических форм пульпита и периодонтита остается высокой и составляет от 32% до 50%, что связывают со свойствами микробной биопленки. Однако исследования этого объекта в корневых каналах и методов эрадикации биопленок повсеместно находятся в начальной фазе исследования.

**Цель исследования** – лабораторное обоснование и оценка эффективности комплексного воздействия ультразвуковой обработки и фотоактивируемой дезинфекции корня зуба при хронических формах пульпита и периодонтита, а также оценка эффективности эндодонтического лечения с применением сканирующей электронной микроскопии.

**Материалы и методы.** Микрофлору корневых каналов изучали бактериологическим методом (4 бактериальных и 2 грибковых клинических изолята). Влияние ультразвуковой обработки в комплексе с системой фотоактивируемой дезинфекции на микрофлору корневого канала оценивали с использованием биореактора. Исследование биопленок системы корневых каналов зуба у больных хроническими формами пульпита (52 человека) и периодонтита (16 человек) проведено с использованием сканирующей электронной микроскопии.

**Результаты.** Установлено наличие обильной микробной биопленки в устьях дентинных канальцев и obturation дентинных канальцев в отдельных случаях. Описаны особенности формирования кривых роста популяций бактерий оральной микрофлоры (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Candida krusei*) в результате комплексного воздействия фотодинамической активации и ультразвука по сравнению с контролем без такового. Комплексное воздействие существенно угнетает рост микробных популяций оральных бактерий и грибов рода *Candida*.

**Ключевые слова:** корневые каналы, микробная биопленка, сканирующая электронная микроскопия, эндодонтическое лечение, ультразвуковая ирригация, фотодинамическая терапия, биореактор, антимикробная активность *in vitro*

**Для цитирования:** Царёв В.Н., Подпорин М.С., Ипполитов Е.В. Оценка эффективности эндодонтической дезинфекции корневых каналов зуба с применением сканирующей электронной микроскопии микробной биопленки. Бактериология. 2017; 2(1): 6–13. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-6-13

## Evaluating of the effectiveness of endodontic disinfection of root channels by using scanning electron microscopy of microbial biofilms

V.N.Tsarev, M.S.Podporin, E.V.Ippolitov

Moscow State University of Medicine and Dentistry n.a. A.I. Evdokimov, Moscow, Russia

The frequency of complications after endodontic treatment of chronic forms of pulpitis and periodontitis remains high and ranges from 32% to 50%, which is associated with the properties of microbial biofilms. However, studies of this object in the root canals and biofilm eradication methods are in the initial phase.

**The objective.** The goal is laboratory study and evaluation of comprehensive effects of ultrasonic treatment and photoactivated disinfection of the tooth root at chronic forms of pulpitis and periodontitis as well as evaluation of the effectiveness of endodontic treatment by scanning electron microscopy.

**Materials and methods.** Microflora of root canals was studied by bacteriological method (4 bacterial and 2 fungal clinical isolates). Effect of ultrasonic treatment in combination with photoactivated disinfection of the root canal system on the microflora was evaluated using a bioreactor. A biofilm root canal system in patients with chronic forms of pulpitis (52 people) and periodontitis (16 people) was studied by scanning electron microscopy.

**Results.** In some cases, the presence of abundant microbial biofilms in the mouths of dentinal tubules and obturation of dentinal tubules was found. Growth curves features of the oral microflora bacterium populations (*Porphyromonas gingivalis*; *Fuso-*

### Для корреспонденции:

Царёв Виктор Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии ГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова

Адрес: 123425, Москва, ул. Дедегатская, 20/1  
Телефон: (915) 401-9131  
E-mail: nikola777@rambler.ru

Статья поступила 19.12.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

### For correspondence:

Viktor N. Tsarev Sc.D.(Med), professor. Director of Research Institute of Medicine and Dentistry, Head of Department by microbiology, virology and immunology of Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Yevdokimov

Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation  
Phone: (915) 401-9131  
E-mail: nikola777@rambler.ru

The article was received 19.12.2016, accepted for publication 15.03.2017

*bacterium nucleatum; Streptococcus sanguinis; Streptococcus mutans; Candida albicans; Candida krusei*) after complex effects of photodynamic activation and ultrasound were described. It was shown that the combined effect significantly inhibits the growth of microbial populations of oral bacteria and fungi of the genus *Candida*.

**Keywords:** *root channels, microbial biofilm, scanning electron microscopy, endodontic treatment, ultrasonic irrigation, photodynamic therapy, bioreactor, in vitro antimicrobial activity*

**For citation:** Tsarev V.N., Podporin M.S., Ippolitov E.V. Evaluating of the effectiveness of endodontic disinfection of root channels by using scanning electron microscopy of microbial biofilms. *Bacteriology*. 2017; 2(1): 6–13. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-6-13

Около трети всех осложнений кариеса зубов в структуре стоматологических заболеваний выпадает на долю пульпитов и периодонтитов. Однако результаты общепринятого эндодонтического лечения пациентов не могут считаться вполне удовлетворительными, так как частота осложнений по результатам лечения остается высокой и колеблется, по данным литературы, от 32% до 50% в сроки наблюдения свыше двух лет [1, 2].

Сложившиеся в стоматологической науке представления о морфологии пульпы зуба, физиологических и патофизиологических процессах, протекающих в ней, позволяют поновому взглянуть на методики лечения, заставляя находить все более рациональные решения. Так, современные методики выявления патогенных микроорганизмов позволили больше узнать о составе микрофлоры инфицированных каналов, что способствовало повышению эффективности дезинфекции.

В стремительно развивающихся технологиях аэробного и анаэробного культивирования бактерий исследователями высказывается единодушное мнение, что осложнения кариеса зубов имеют полибактериальный характер. Среди патогенов, колонизирующих корневые каналы, выделяют грамотрицательные облигатно-анаэробные палочки разных таксономических групп, а также микроаэрофильные стрептококки [3, 4].

Эндодонтическая обработка каналов остается основным этапом в комплексной терапии заболеваний пульпы, и от того, как проведен этот этап, напрямую зависят отдаленные результаты лечения [5, 6]. В ходе инструментальной обработки образуется так называемый «смазанный слой», который представляет собой конгломерат аморфного клейкого вещества, содержащего отростки одонтобластов, микроорганизмы, остатки тканей пульпы и неорганический матрикс дентина. Бактерии проникают в дентинные каналы, и детрит быстро блокирует латеральные анатомические ответвления, тем самым создавая условия для формирования биопленки, которая, по-видимому, создает условия для дальнейшего размножения бактерий в системе дентинных канальцев [7].

В связи с остротой этой проблемы предложено использование дополнительных физических воздействий, которые, по мнению авторов, способствуют разрушению биопленки. Одним из наиболее популярных является в настоящее время метод фотоактивируемой дезинфекции. Он основан на использовании различных фотобиологических эффектов, вызываемых посредством сочетанного применения светового излучения, кислорода и фотосенсибилизатора [8]. Особое значение приобретает также качественная ирригация корневых каналов с активацией ирриганта с помощью ультразвукового файла пьезоэлектрической группы, что, возможно, повышает эффективность эндодонтического лечения с точки зрения очистки стенок дентинных канальцев [9].

Целью нашего исследования являлось лабораторное обоснование и оценка эффективности комплексного воздействия ультразвуковой обработки и фотоактивируемой дезинфекции корня зуба при хронических формах пульпита и периодонтита, а также оценка эффективности эндодонтического лечения с применением программируемого биокультивирования штаммов и сканирующей электронной микроскопии.

## Материалы и методы

Всего было обследовано 84 пациента с диагнозом хронический пульпит, в том числе: 29 с диагнозом хронический фиброзный пульпит (ХФП) и 21 с хроническим гангренозным пульпитом (ХГП); 34 пациента с диагнозом хронический периодонтит в фазе обострения. Возраст пациентов составил от 25 до 45 лет (для чистоты эксперимента, т.к. у пациентов более старшего возраста была выявлена общесоматическая патология).

В **клинической части** исследования в каждой группе методом случайной выборки были сформированы по 2 подгруппы:

- 1-ю подгруппу сравнения, или контрольную, составили пациенты, которым проводилась традиционная методика лечения, и сопровождалась взятием материала для проведения сканирующей электронной микроскопии системы дентинных канальцев (СЭМ).

Структуру биопленки корневых каналов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием двулучевого микроскопа «Quanta 200 3D» (FEI Company, USA) в режиме высокого вакуума, при ускоряющих напряжениях 5 кВ, с предварительным напылением золотом (999) в установке «SPI-Module Sputter/Carbon Coater System» (SPI Inc. USA);

- 2-ю подгруппу исследования – основную составили пациенты, которым проводили комплексное лечение с использованием ультразвуковой активации ирриганта и дальнейшей фотодинамической обработкой.

В подгруппе сравнения традиционная методика эндодонтического лечения проводилась в соответствии с протоколом Европейского общества эндодонтистов, а в основной подгруппе, после процедуры механической обработки каналов, проводили медикаментозную обработку с использованием ультразвуковой активации ирриганта на протяжении 10 секунд, затем проводилась фотодинамическая дезинфекция на протяжении 30 секунд, повторная обработка проводилась с сокращенной экспозицией в 2 раза (5 секунд УЗ, 15 секунд ФДТ соответственно). Соотношение проводимых процедур в процессе лечения составило 1 : 1.

В **экспериментальной части** исследования для оценки воздействия ультразвуковой активации ирриганта на штаммы

микроорганизмов использовали аппарат пьезоэлектрической группы «Ultrasonic DTE-D5», а для проведения фотоактивируемой дезинфекции – аппарат «Fotosan 360» с применением в качестве фотосенсибилизатора толуидинового синего.

Микробиологическое изучение патологического содержания корневых каналов осуществляли с помощью бактериологического метода исследования, включавшего в обязательном порядке анаэробное культивирование путем количественных высевов на питательную среду M144 (Himedia, Индия) с добавлением крови (для культивирования грамотрицательных анаэробных и грамположительных микроаэрофильных бактерий) и M1297A (Himedia, Индия) для грибов рода *Candida*.

Посевы помещали в термостат при температуре 37°C на 48 ч (для анаэробных культур – в анаэроцист на 7 сут), после чего использовали автоматическую систему подсчета количества колоний «Scan 500» (Interscience, Франция).

Из числа выделенных штаммов для экспериментальной части исследования были отобраны наиболее часто встречающиеся у обследованных нами пациентов (4 – бактериальных и 2 – грибковых клинических изолята): *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Candida krusei*.

В экспериментальной части исследования проводили оценку влияния ультразвуковой обработки в комплексе с системой фотоактивируемой дезинфекции на микрофлору корневого канала с использованием биореактора «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия). В настоящем исследовании данная система, предназначенная для культивирования микроорганизмов и оценки их роста в режиме реального времени, была использована нами впервые в отечественной практике для культивирования анаэробных бактерий пародонтопатогенной группы, стрептококков и грибов рода *Candida*. Интерпретацию результатов проводили по изменению оптической плотности при длине волны  $\lambda = 850$  нм.

Для определения чувствительности выделенных штаммов применяли собственную модификацию метода серийных разведений, разработанную на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И.Евдокимова.

В стерильные пластиковые пробирки Eppendorf помещали в равном соотношении взвесь испытуемого штамма и фотосенсибилизатор (по 0,20 мл соответственно), что в конечном количестве равнялось  $10^6$  КОЕ (колониеобразующих единиц) (в логарифмическом выражении 6,0 соответственно). Экспозиция при ультразвуковой обработке – 10 секунд.

При проведении эксперимента первоначально помещали наконечник ультразвукового аппарата непосредственно в бактериальную взвесь, включали на необходимый период времени, а затем добавляли ФС и помещали наконечник диодного аппарата и световое излучение на 30 секунд (в соответствии с инструкцией). В качестве контроля использовали бактериальную взвесь без последующей дальнейшей ее обработки.

Для культивирования микроорганизмов в биореакторе использовали 2 типа пробирок: пробирки 50 мл с мембранным фильтром (TubeSpin®) для аэробов и пробирки 50 мл по типу

Falcon с крышкой без мембраны. В каждую пробирку добавляли 15 мл питательной среды и вносили заранее подготовленную бактериальную взвесь с помощью биохимической пипетки.

Пробирки помещали в биореактор и с помощью программного обеспечения задавали необходимые параметры культивирования. Для каждого вида микроорганизмов использовали свои настройки биореактора:

- *Porphyromonas gingivalis* (Temperature: 37°C; RPM: 1200 min<sup>-1</sup>; Measurement freq.: 3 h<sup>-1</sup>; Rev. Spin period: 1 sec; Volume: 15 ml  $\lambda$ : 850 nm);

- *Fusobacterium nucleatum* (Temperature: 37°C; RPM: 1200 min<sup>-1</sup>; Measurement freq.: 2 h<sup>-1</sup>; Rev. Spin period: 2 sec; Volume: 15 ml  $\lambda$ : 850 nm);

- *Streptococcus sanguis* (Temperature: 37°C; RPM: 1500 min<sup>-1</sup>; Measurement freq.: 3 h<sup>-1</sup>; Rev. Spin period: 2 sec; Volume: 15 ml  $\lambda$ : 850 nm);

- *Streptococcus mutans* (Temperature: 37°C; RPM: 1700 min<sup>-1</sup>; Measurement freq.: 3 h<sup>-1</sup>; Rev. Spin period: 2 sec; Volume: 15 ml  $\lambda$ : 850 nm);

- *Candida albicans* (Temperature: 37°C; RPM: 1300 min<sup>-1</sup>; Measurement freq.: 3 h<sup>-1</sup>; Rev. Spin period: 3 sec; Volume: 15 ml  $\lambda$ : 850 nm);

- *Candida krusei* (Temperature: 37°C; RPM: 1300 min<sup>-1</sup>; Measurement freq.: 3 h<sup>-1</sup>; Rev. Spin period: 3 sec; Volume: 15 ml  $\lambda$ : 850 nm).

Культивирование проводили для грибов – в течение 2 сут, для пародонтопатогенных видов бактерий и стрептококков – в течение 5 сут. Регистрация точек кривой роста – каждые 4 ч.

Результаты эксперимента отображались на графике динамики изменения оптической плотности на протяжении всего периода культивирования. По ключевым точкам кривых роста микробных популяций проводили статистическую обработку данных в 5 повторях и обрабатывали методом параметрической статистики для малой выборки по Манну-Уитни ( $p < 0,05$ ).

### Результаты клинико-лабораторных исследований

В клинической части нашей работы мы сравнивали частоту диагностируемых осложнений при лечении различных форм хронического пульпита и периодонтита, а именно: потребность в повторном эндодонтическом лечении, а также необходимость проведения оперативного хирургического вмешательства. На диаграммах (рис. 1) видно, что в подгруппах, где использовалась стандартная методика лечения, процент повторного лечения и хирургического вмешательства превалирует по сравнению с исследуемой группой (в среднем в 1,5–2 раза чаще).

Как известно, система корневого канала зуба часто имеет сложную морфологию, особенно жевательной группы зубов. Идеально круглый в поперечном сечении, конусовидный корневой канал с одним апикальным отверстием является, пожалуй, редким исключением. Тем самым, достичь полноценной очистки, стерилизации и оптимального формирования стенок корневых каналов возможно далеко не во всех случаях. В подавляющем большинстве случаев каналы имеют неправильную форму, различный диаметр в букколингвальном

и мезиодистальном направлении, многочисленные поднутрения, так называемые «плавники». От основного канала на разных уровнях отходит множество латеральных канальцев. Известно, что основной канал в апикальной части образует дельту и открывается на верхушке корня не одним, а несколькими апикальными отверстиями [10, 11].

По данным литературы, при эндодонтической обработке формируется «смазанный слой», содержащий микроорганизмы [4, 11]. Считается, что «смазанный слой» для микроорганизмов является питательной средой, а также препятствует полноценной адгезии пломбирочных материалов к стенкам корневых каналов. Поэтому при сканирующей электронной микроскопии он представлен элементами микробной биопленки, что подтверждено нашими исследованиями.

В нашем исследовании с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) установлено наличие высокого уровня микробной контаминации «смазанного слоя» в зоне

корневого канала и дентинных канальцев (рис. 2). На микрофотографии при увеличении 1500 раз видны устья дентинных канальцев, которые obturированы скоплениями микроорганизмов, формирующих биопленку (рис. 2А). При увеличении 5000 раз хорошо различимы палочковидные (бактероидные) микробные клетки и округлые дрожжевые элементы грибов (рис. 2Б).

После применения комплексной эндодонтической дезинфекции происходило разрушение матрикса биопленки и удаление микробных скоплений, obturирующих устья дентинных канальцев. При этом «смазанный слой» частично сохранялся (рис. 3).

Таким образом, ассоциации микроорганизмов полости рта колонизируют экосистему корневых каналов в виде биопленки, это существенно затрудняет их удаление из системы корневых каналов, а также препятствует полноценной деконтаминации системы корневых каналов от микроорганизмов. Данное обстоятельство явилось основани-

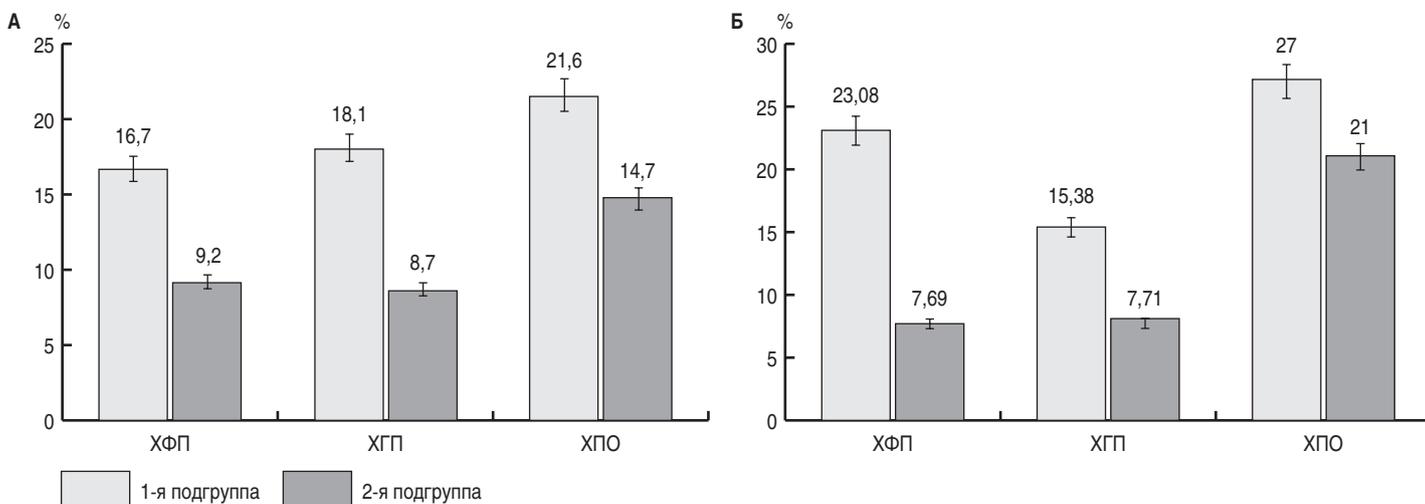


Рис. 1. Клинические показатели эффективности комплексного физиотерапевтического лечения (УЗ + ФДТ): А – частота повторного эндодонтического лечения; Б – частота осложнений, требующих хирургического лечения (ХФП – хронический фиброзный пульпит, ХГП – хронический гангренозный пульпит, ХПО – хронический периодонтит).

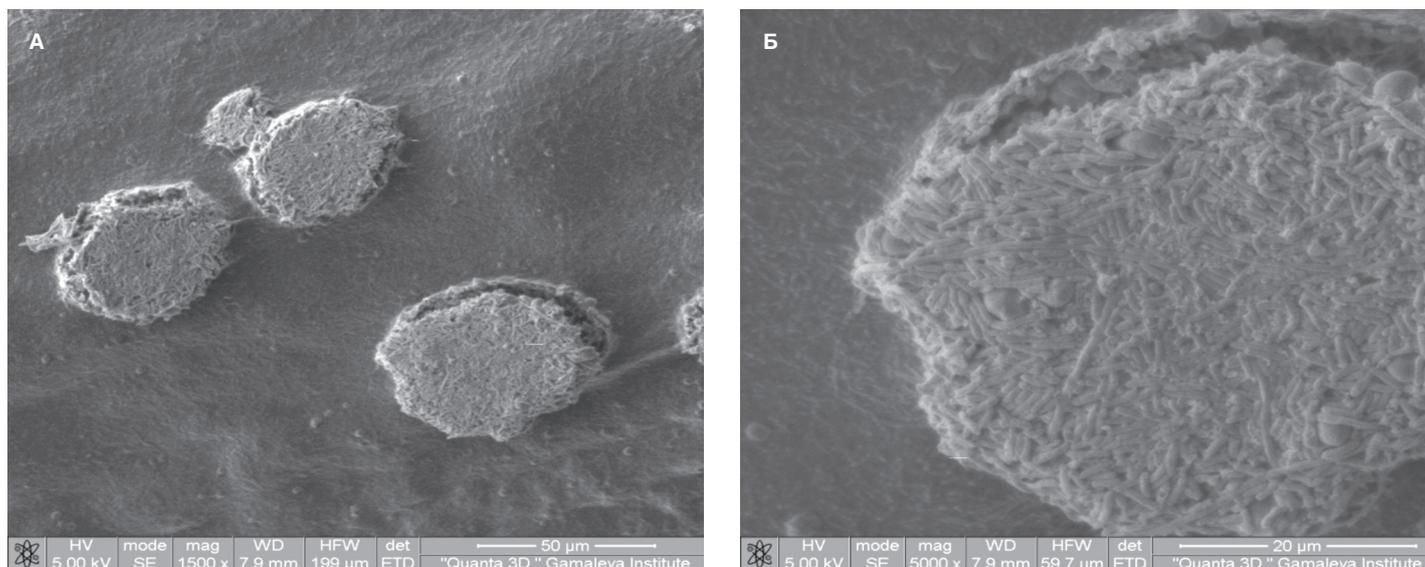


Рис. 2. Микробная obturация дентинных канальцев. Сканирующая электронная микроскопия: А – видны устья трех канальцев. Ув. 1500 раз; Б – устье одного из канальцев. Ув. 5000 раз.

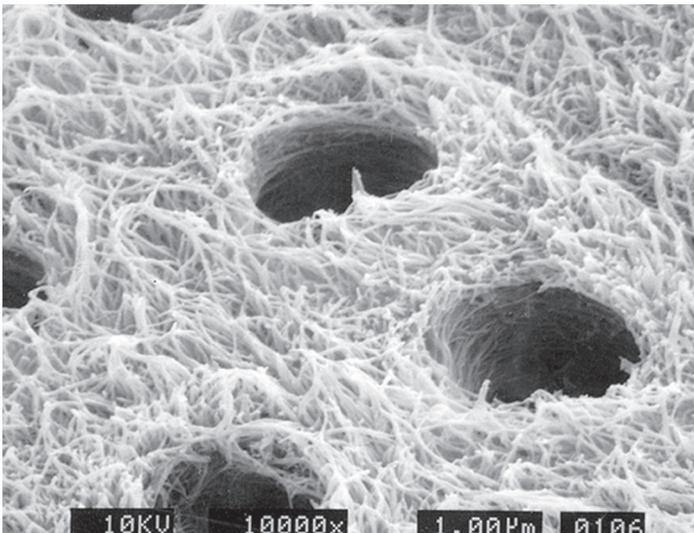


Рис. 3. Устья дентинных канальцев после эндодонтической дезинфекции (остатки «смазанного слоя»). Сканирующая электронная микроскопия (ув. 10 000 раз).

ем для расширения нашего исследования в экспериментальной части. Используя новейшие технологии культивирования бактерий с автоматизированным мониторингом этого процесса, мы провели сравнительную оценку фотодинамического и ультразвукового воздействия на разные типы микроорганизмов – возбудителей эндодонтической инфекции.

### Результаты экспериментальной части

Оценка чувствительности к ультразвуковой обработке в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией штаммов грамотрицательных анаэробных бактерий с использованием модифицированного метода разведений показала следующее (рис. 4).

На представленных графиках видно, что лаг-фаза, охватывающая промежуток от момента посева бактерий до начала их роста, продолжалась в среднем одинаково у всех исследуемых штаммов – в пределах суток. Так, для *Porphyromonas gingivalis* начало роста отмечалось на 16-й ч

культивирования, а для *Fusobacterium nucleatum* – на 20-й ч, как в контрольной, так и исследуемой пробе. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза, характеризующаяся прогрессирующим нарастанием скорости деления клеток, имела достоверные отличия как по достижению максимума биомассы (определяемой при данной методике по оптической плотности – OD), так и по скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности контрольной пробы составили: *Porphyromonas gingivalis* – 2,37 OD (40 h); *Fusobacterium nucleatum* – 2,45 OD (48 h). Задержку логарифмической фазы и переход в стационарную фазу в исследуемых пробах наблюдали еще через 20–28 ч культивирования. Показатели пикового максимума оптической плотности исследуемой пробы составили: *Porphyromonas gingivalis* – 1,47 OD (88 h); *Fusobacterium nucleatum* – 1,46 OD (44 h) соответственно.

При оценке чувствительности к ультразвуковой обработке в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией штаммов грамположительных бактерий установлено, что лаг-фаза роста данных бактериальных популяций продолжалась немного дольше, чем у грамотрицательных бактерий, и заканчивалась к 24 ч культивирования как в контрольной, так и исследуемой пробе (рис. 5). Экспоненциальная (логарифмическая) фаза также имела достоверные отличия: как по достижению максимума биомассы, так и по скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности контрольной пробы составили: *Streptococcus sanguis* – 2,39 OD (40 h); *Streptococcus mutans* – 2,49 OD (48 h). Задержку логарифмической фазы и переход к стационарной фазе в исследуемых пробах наблюдали в промежутке от 32 ч до 40 ч культивирования. Наиболее чувствительным к УЗ и ФД обработке оказался *Streptococcus sanguis* – максимум был отмечен на 36 ч и составил 1,58 OD; более устойчивым оказался *Streptococcus mutans* – 2,01 OD (44 h).

В экспериментах с грибами рода *Candida* (рис. 6) видно, что лаг-фаза продолжалась не более 6 ч как в контрольной, так и в исследуемой пробе. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза была для разных видов различна, особенно в скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности в контрольной пробе составили: *Candida albicans* – 7,81 OD (58 h); *Candida krusei* – 8,5 OD

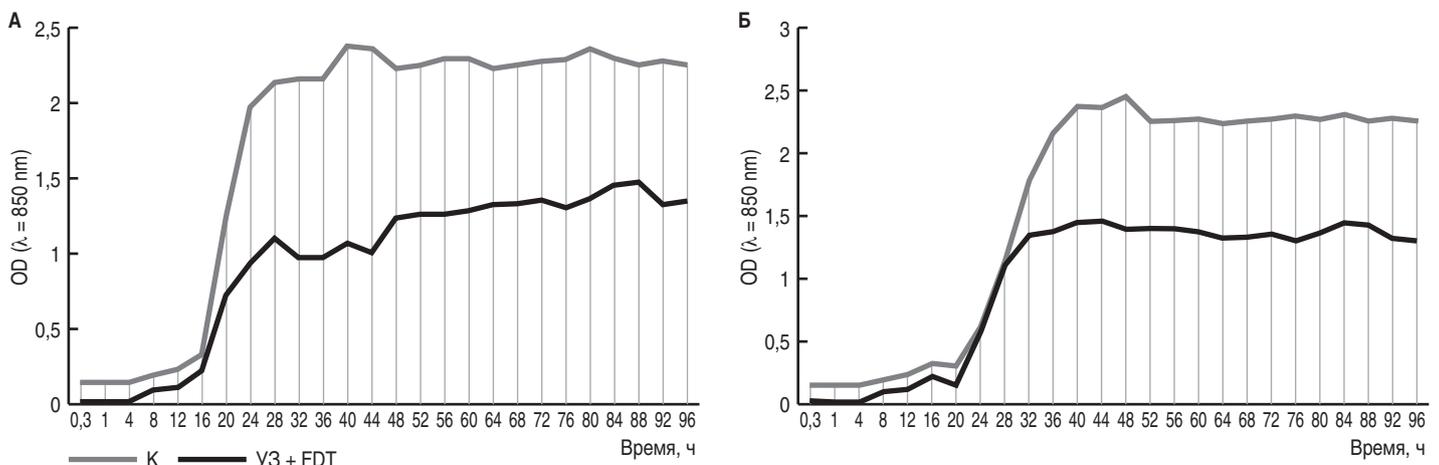


Рис. 4. Оценка чувствительности штаммов грамотрицательных бактерий к комплексному физиотерапевтическому воздействию: ультразвуковая (УЗ) + фотодинамическая (ФДТ) обработка *in vitro* (А – *Porphyromonas gingivalis*; Б – *Fusobacterium nucleatum*).

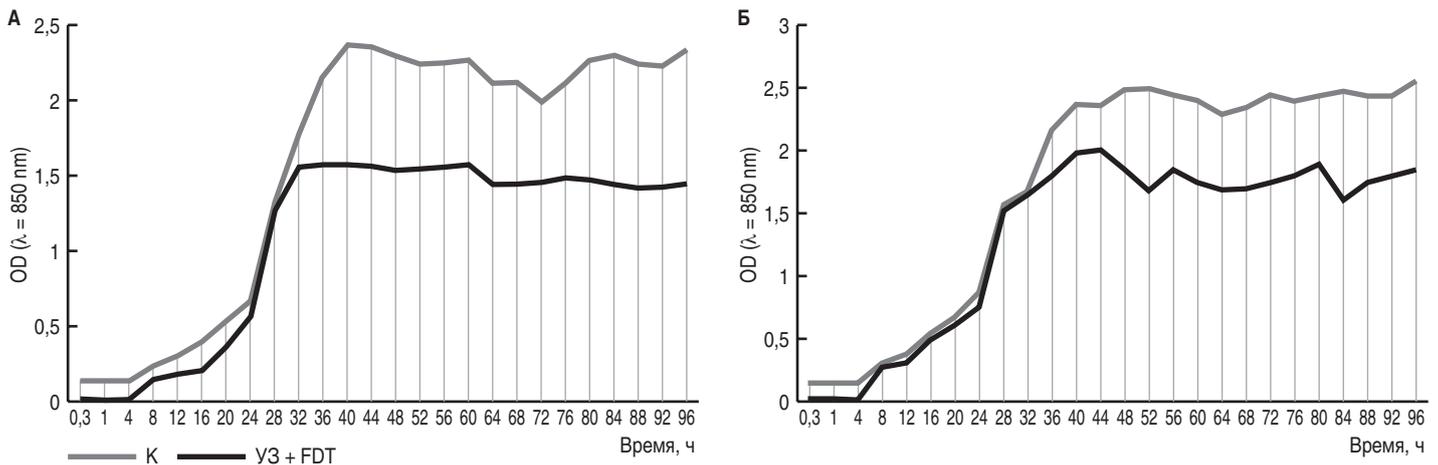


Рис. 5. Оценка чувствительности штаммов грамположительных бактерий к комплексному физиотерапевтическому воздействию: ультразвуковая (УЗ) + фотодинамическая (FDT) обработка *in vitro* (А – *Streptococcus sanguis*; Б – *Streptococcus mutans*).

(62 h). Задержка логарифмической фазы в исследуемых пробах наблюдалась на промежутке от 14 до 34 ч культивирования, причем у *Candida krusei* к 14 ч существенно снизилась скорость прироста клеток, а задержка лог-фазы отмечалась только на 34 ч. Наиболее чувствительным к УЗ и ФД обработке оказался *Candida albicans* – максимум был отмечен на 22 ч и составил 5,61 OD; более устойчивым оказался *Candida krusei* – 6,56 OD (42 h).

Суммарные данные, демонстрирующие выявленные усредненные тенденции роста бактериальных популяций в условиях ультразвуковой обработки в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией, представлены в таблице.

Как следует из представленных данных, для всех исследованных штаммов наблюдали статистически достоверную тенденцию к снижению воспроизводства бактериальной популяции после рассматриваемого вида физического воздействия (фотоактивация и ультразвук). Наиболее выраженное угнетение роста бактериальных популяций наблюдалось при сравнении таких узловых точек кривых роста, как начало подъема логарифмической фазы и в стационарной фазе, однако полного прекращения роста бактериальных популяций и изменения траектории кривой роста ни в одном случае в эксперименте мы не наблюдали.

### Обсуждение результатов

Полученные в нашем исследовании результаты позволяют предположить, что любой из представителей микробиоты, колонизирующей поверхность зуба, может контаминировать кариозную полость и проникнуть в пульпу зуба и далее – в систему дентинных канальцев, что является причиной воспалительного процесса. К ранним колонизаторам, которые формируют начальную биопленку, относят различные виды микроаэрофильных стрептококков, обладающих высокими адгезивными свойствами по отношению к эмали зуба. К промежуточным колонизаторам относят фузобактерии, к поздним – большинство представителей пародонтопатогенных видов (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* и др.).

По данным наших предыдущих исследований, из системы дентинных каналов могут выделяться с высокой частотой (от 50 до 90%) представители облигатно-анаэробных видов – *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptococcus niger*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Tannerella forsythia*, но с меньшей (от 25 до 40%) – представители преимущественно микроаэрофильных видов – *Streptococcus sanguis*, *Propionibacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Acti-*

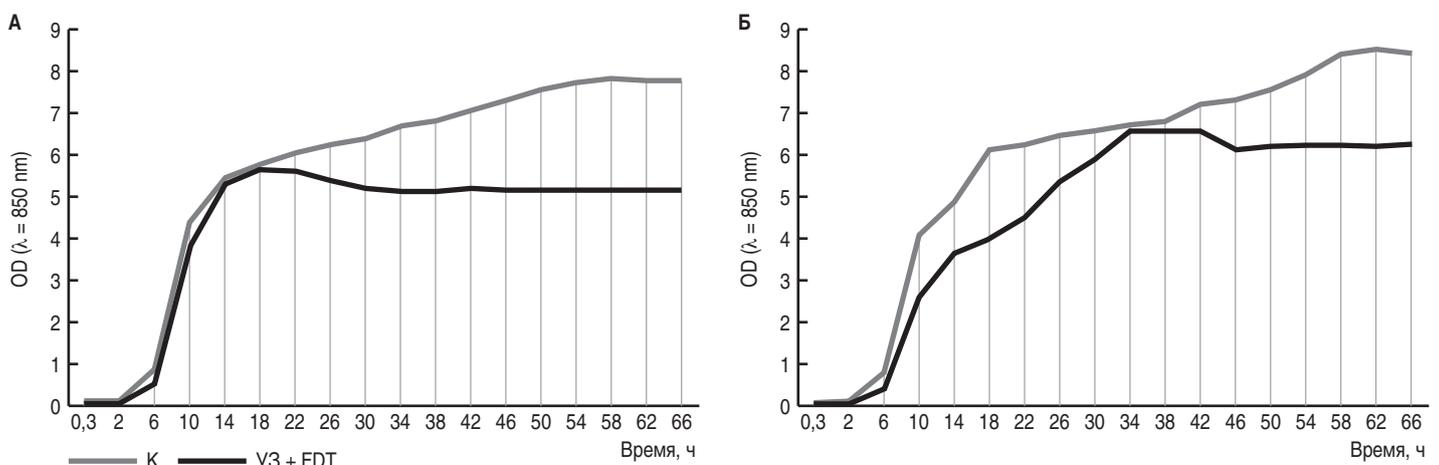


Рис. 6. Оценка чувствительности штаммов дрожжевых грибов рода *Candida* к комплексному физиотерапевтическому воздействию: ультразвуковая (УЗ) + фотодинамическая (FDT) обработка *in vitro* (А – *Candida albicans*; Б – *Candida krusei*).

Таблица. Сравнительная характеристика количественных параметров роста микробных популяций с учетом узловых точек кривой роста (по оптической плотности)

Точка кривой роста	Штамм											
	<i>P. gingivalis</i>		<i>F. nucleatum</i>		<i>S. sanguis</i>		<i>S. mutans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>	
	К	ФД ± УЗ	К	ФД ± УЗ	К	ФД ± УЗ	К	ФД ± УЗ	К	ФД ± УЗ	К	ФД ± УЗ
Начало подъема лаг-фазы	0,19 ± 0,04	0,09* ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,09* ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,15* ± 0,04	0,30 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,07 ± 0,03
Начало подъема логарифм. фазы	0,32 ± 0,04	0,21* ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,15* ± 0,02	0,67 ± 0,04	0,57* ± 0,04	0,54 ± 0,04	0,61 ± 0,04	0,85 ± 0,04	0,53* ± 0,04	0,8 ± 0,05	0,46* ± 0,04
Начало подъема стац. фазы	2,13 ± 0,05	0,93* ± 0,04	2,37 ± 0,05	1,34* ± 0,04	2,37 ± 0,05	1,56* ± 0,04	2,37 ± 0,05	1,8* ± 0,03	6,69 ± 0,05	5,28* ± 0,05	6,1 ± 0,05	5,89* ± 0,05
Средний показатель стац. фазы	2,26 ± 0,05	1,22* ± 0,03	2,28 ± 0,05	1,37* ± 0,03	2,23 ± 0,05	1,51* ± 0,03	2,42 ± 0,05	1,79* ± 0,04	7,38 ± 0,05	5,24* ± 0,05	7,23 ± 0,05	6,27* ± 0,05

Примечание: \* достоверное снижение показателя при исследуемом физическом воздействии ( $p < 0,05$ ).

*nomycetes spp.*, а также некоторых облигатно-анаэробных – *Streptococcus intermedius*, *Treponema denticola*, *Eubacterium spp.* При этом частота выделения стафилококка составляла всего лишь 6,2%, энтерококка – 24,1%, а грибов рода *Candida* – 13,8% [12].

В связи с остротой этой проблемы предложено использование дополнительных физических воздействий, которые, по мнению авторов, способствуют разрушению биопленки. Одними из наиболее популярных являются в настоящее время являются методы ультразвуковой и фотоактивируемой дезинфекции.

В эндодонтии ультразвук стали применять благодаря эффекту кавитации (в жидкой среде – формирование пузырьков пара, сопровождающееся шумом и гидравлическими ударами) и акустическим вихревым потокам, возникающим вокруг эндодонтического файла в процессе работы. Вихревые потоки разбивают детрит корневого канала на опилки и нагревают дезинфицирующий раствор, что значительно повышает качество эндодонтического лечения и создает условия для герметичной obturации корневого канала, что можно рассматривать как одно из перспективных направлений лечения [6, 10]. Считается доказанным, что применение ультразвуковой активации ирриганта в процессе обработки корневого канала является более эффективной методикой по сравнению с традиционным ручным методом обработки [4, 9].

Фотоактивируемая дезинфекция с использованием различных фотосенсибилизаторов, индуцирующих цепную фотохимическую реакцию с выбросом высокоактивных окислителей, также позиционируется как обнадеживающий метод разрушения полимерного матрикса биопленки [1, 7, 8].

Вместе с тем представляется крайне важным, что полного прекращения роста и гибели всех микроорганизмов, как это гипотетически предполагалось или позиционировалось в исследованиях некоторых авторов, изучавших эффективность ФДТ или ультразвуковой ирригации, на самом деле не происходит. Как показали наши экспериментальные данные, сохраняется даже траектория кривой роста, свойственная данному виду (или штамму) с присущими особенностями узловых точек, но на более низком уровне. Следовательно, данный вариант эндодонтической дезинфекции с использо-

ванием физических факторов деконтаминации может быть охарактеризован как бактериостатический, но не бактерицидный.

Нельзя не учитывать и тот негативный фактор, что в клинических условиях микробы находятся в ассоциации, да к тому же защищенной матрицей биопленки. Доказано, что полисахаридный матрикс является специфическим барьером для проникновения внутрь биопленки антибактериальных агентов, в связи с чем повышается резистентность микробов к антисептикам и антибиотикам [3, 5, 12].

Обсуждая механизмы эффективности ультразвука и фотодинамической активации в том виде, как они технически обеспечиваются сегодня, к сожалению, можно говорить лишь о бактериостатическом воздействии, однако его может быть вполне достаточно для улучшения микробиологической ситуации в системе корневых каналов и включения механизмов иммунной защиты. По-видимому, это и определяет те положительные результаты, которые получены в наших клинических исследованиях и исследованиях других авторов, использовавших данные виды физической дезинфекции системы корневых каналов зуба.

## Заключение

При проведении сканирующей электронной микроскопии подтверждено наличие обильной микробной колонизации «смазанного слоя» в области устьев дентинных канальцев корня зуба, имеющей признаки микробной биопленки, представленной ассоциацией бактериоидных и дрожжевых клеток. Установлена obturация пролиферирующей микробной биопленкой устьев дентинных канальцев, что является показанием для применения физических методов воздействия для более полноценной эрадикации микробной флоры дентинных канальцев.

Как показали наши исследования, фотоактивируемая дезинфекция в комплексе с ультразвуковой активацией ирриганта *in vitro* по-разному влияет на процесс размножения микробных клеток штаммов – представителей нормальной микрофлоры полости рта и бактерий пародонтопатогенной группы, а также на размножение грибов рода *Candida*, но во всех случаях имеет место бактериостатический эффект, вы-

ражающийся в торможении размножения бактерий или грибов по сравнению с контрольными образцами.

При анализе динамики роста популяций бактерий и грибов у них были установлены различия в наступлении основных фаз кривой роста популяции, максимума размножения (стимуляции роста) и перехода к стационарной фазе. Кривые роста бактериальных популяций *in vitro* во всех случаях (со всеми использованными штаммами бактерий и дрожжевых грибов) демонстрировали статистически достоверное снижение по сравнению с контрольными образцами.

Вместе с тем даже сочетанного применения физических факторов деконтаминации (фотодинамическая активация и ультразвук), по-видимому, недостаточно для достижения идеального варианта эндодонтической обработки, к которому сегодня стремятся стоматологи.

## Литература

1. Чунихин АА, Митронин АВ. Эндодонтическое лечение пульпита: традиционные и современные подходы. Эндодонтия Today. 2009;4:3-10.
2. Hess JC, Medioni E, Vene G. Therapeutique endodontique. Ensemble pulpodentarie. Pulpotomie. Encycl Med Chir Odontologie. 2002;1:201-15.
3. Ипполитов ЕВ, Диденко ЛВ, Царёв ВН. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(12):59-64.
4. Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonic in endodontics: a review of the literature. J Endod. 2007;33(2):81-95. DOI: 10.1016/j.joen.2006.10.008
5. Бир Р, Бауман М, Ким С. Эндодонтия: монография. Пер. с англ. Под ред. проф. Т.Ф.Виноградовой. М.: МЕДпрессинформ; 2004, 368 с.
6. Зюзина ТВ. И снова об ирригации в эндодонтии. Эндодонтия Today. 2009;4:11-5.
7. Lambrechts P, Huybrechts B, Bergmans L, et al. Photoactivated disinfection (PAD): paintball endodontics. Endo Tribune. 2006;1(7).
8. Царёв ВН, Арутюнов СД, Малазониya ТТ, Царева ЕВ, Подпорин МС, Ипполитов ЕВ, и др. Оценка антимикробного действия фотодинамической терапии на возбудителей неклостридиальной анаэробной инфекции пародонта в экспериментальных и клинических исследованиях. Клиническая стоматология. 2015;4(76):14-9.
9. Рабинович ИМ, Корнетова ИВ. Клиническое применение ультразвука при эндодонтическом лечении. Клиническая стоматология. 2012;4(64):10-4.
10. Деннхардт Х. Ультразвук в эндодонтии. Медицинский алфавит. 2014;217(1):10-13.
11. Ruddle CJ. Endodontic access preparation: an opening for success. Dent Today. 2007;26(2):114-9.
12. Царёв ВН, Дмитриева ЛА, Ипполитов ЕВ, Нисанова СЕ. Последовательное применение антибактериальных и детоксицирующих препаратов при эндодонтическом лечении хронического апикального периодонтита (Клинико-экспериментальное исследование). Эндодонтия Today. 2013;1:8-14.
2. Hess JC, Medioni E, Vene G. Therapeutique endodontique. Ensemble pulpodentarie. Pulpotomie. Encycl Med Chir Odontologie. 2002;1:201-15.
3. Ippolitov EV, Didenko LV, Tzarev VN. The characteristics of morphology of biofilm of periodontium under inflammatory diseases of gums (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, Candida-associated periodontitis) according results of electronic microscopy. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2015;60(12):59-64. (In Russian).
4. Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonic in endodontics: a review of the literature. J Endod. 2007;33(2):81-95. DOI: 10.1016/j.joen.2006.10.008
5. Bir R, Bauman M, Kim S. Endodontics. Monograph. Ed. with English. Ed by T.F.Vinogradova. Moscow: "MEDpressinform" Publ.; 2004, 368 p. (In Russian).
6. Zyuzina TV. Again on irrigation in endodontics. Endodontology Toda. 2009;4:11-5. (In Russian).
7. Lambrechts P, Huybrechts B, Bergmans L, et al. Photoactivated disinfection (PAD): paintball endodontics. Endo Tribune. 2006;1(7).
8. Tzarev VN, Arutyunov SD, Malazoniya TT, Tsareva EV, Podporin MS, Ippolitov EV, et al. Assessment of photodynamic therapy antimicrobial effect on nonclostridial parodontium anaerobic infection pathogens in experimental and clinical study. Clinical Dentistry. 2015;4(76):14-9. (In Russian).
9. Rabinovich IM, Kornetova IV. Clinical use of ultrasound in endodontic treatment. Clinical Dentistry. 2012;4(64):10-4. (In Russian).
10. Denhardt H. Ultrasound in endodontics. Medical alphabet. 2014;217(1):10-13. (In Russian).
11. Ruddle CJ. Endodontic access preparation: an opening for success. Dent Today. 2007;26(2):114-9.
12. Tzarev VN, Dmitrieva LA, Ippolitov EV, Nisanova SE. Consistent application of antibacterial and detoxifying drugs in endodontic therapy of chronic apical periodontitis (clinical and experimental study). Endodontology Today. 2013;1:8-14. (In Russian).

### Информация о авторах:

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

Ипполитов Евгений Валерьевич, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий отделом фундаментальных исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова  
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1  
Телефон: (915) 401-9131  
E-mail: ippo@bk.ru

### Information about authors:

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

Evgenii V. Ippolitov, Head of Fundamental Research Department, Research Institute of Medicine and Dentistry of Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov  
Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation  
Phone: (915) 401-9131  
E-mail: ippo@bk.ru

## References

1. Chunikhin AA, Mitronin AV. Endodontic treatment of a pulpitis: traditional and modern approaches. Endodontology Today. 2009;4:3-10. (In Russian).

# Желудочная микробиота при морфологических изменениях гастродуоденального тракта, ассоциированных с инфекцией *Helicobacter pylori*

Г.Ш.Исаева<sup>1</sup>, Л.В.Вакатова<sup>2</sup>, Н.Г.Ефимова<sup>3</sup>, Р.Р.Бурханов<sup>3</sup>, И.Р.Валиуллина<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора РФ, Казань, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан, Казань, Российская Федерация;

<sup>3</sup>ООО «Лечебно-диагностический центр «Фарм-Т», Казань, Российская Федерация;

<sup>4</sup>ГАУЗ «Республиканская клиническая больница» МЗРТ, Казань, Российская Федерация

**Цель.** Изучение микробиоты при морфологических изменениях гастродуоденального тракта.

**Материалы и методы.** Обследовано 104 пациента цитологическим, бактериологическим, масс-спектрометрическим методами.

**Результаты.** При изучении микробного состава желудка была обнаружена смешанная микрофлора, представленная *Helicobacter pylori*, кокками, грибами рода *Candida*, палочковидными бактериями, простейшими. Были обнаружены бактерии следующих родов: *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rothia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*. При исследовании биоптатов пищевода микробный пейзаж был менее разнообразен – выявлены условно-патогенные бактерии рода *Neisseria*, *Gemella* и вида *Rothia mucilaginosa*. В группе *Helicobacter*-положительных пациентов обнаружены грибы *Candida*, *Colletotrichum*, бактерии родов *Thauera*, *Mycoplasma*, при этом у *H. pylori*-негативных пациентов видовой состав микробиоты отличался большим видовым разнообразием. Тяжесть морфологических изменений (атрофия, кишечная метаплазия, дисплазия) коррелировала с частотой обнаружения *H. pylori* и ассоциантов эукариотического происхождения (грибов рода *Candida* и простейших).

**Выводы.** Полученные данные указывают на возможную роль *H. pylori* и других микроорганизмов (преимущественно грамположительных кокков, грамотригативных палочек, дрожжеподобных грибов) в воспалительных процессах слизистой оболочки желудка. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения концепции о существовании ассоциаций *H. pylori* и желудочной микробиоты с хроническими воспалительными процессами.

**Ключевые слова:** гастродуоденальные заболевания, *Helicobacter pylori*, микробиота

**Для цитирования:** Исаева Г.Ш., Вакатова Л.В., Ефимова Н.Г., Бурханов Р.Р., Валиуллина И.Р. Желудочная микробиота при морфологических изменениях гастродуоденального тракта, ассоциированных с инфекцией *Helicobacter pylori*. Бактериология. 2017; 2(1): 14–19. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-14-19

## Gastric microbiota at gastroduodenal tract morphological changes associated with the infection caused by *Helicobacter pylori*

G.Sh.Isaeva<sup>1</sup>, L.V.Vakatova<sup>2</sup>, N.G.Efimova<sup>3</sup>, R.R.Burkhanov<sup>3</sup>, I.R.Valiullina<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation;

<sup>2</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan, Kazan, Russian Federation;

<sup>3</sup>Medical Center «Pharm-T», Kazan, Russian Federation;

<sup>4</sup>Republican Clinical Hospital of the Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan, Kazan, Russian Federation

**The objective.** Studying microbiota at morphological changes of gastroduodenal tract.

**Materials and methods.** The study involved 104 patients tested by cytological, bacteriological methods and mass-spectrometry.

**Results.** Mixed microflora presented by *H. pylori*, cocci, fungi of the genus *Candida*, rod-shaped bacteria, protozoa was discovered during the studying of gastric microbial composition. Bacteria of the following genera: *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rothia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*

### Для корреспонденции:

Исаева Гузель Шавхатовна, доктор медицинских наук, директор ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора РФ

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

Телефон: (843) 236-6721/(843) 236-6741

E-mail: guzelleisaeva@yandex.ru, guisaeva@rambler.ru

Статья поступила 15.12.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

### For correspondence:

Guzel Ch. Isaeva, doctor of medicine, Director, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology

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

Phone: (843) 236-6721/(843) 236-6741

E-mail: guzelleisaeva@yandex.ru, guisaeva@rambler.ru

The article was received 15.12.2016, accepted for publication 15.03.2017

were also detected. During the study of esophagus biopsies microbial landscape was less diverse: conditionally pathogenic bacteria of the genus *Neisseria*, *Gemella* and of the species *Rothia muchilaginosa* were identified. In *Helicobacter*-positive patients *Candida* fungi, *Colletotrichum*, bacteria of the genera *Thaueria*, *Mycoplasma* were observed. In *H. pylori*-negative patients species composition of microbiota was characterized by high species diversity. The severity of morphological changes (atrophy, intestinal metaplasia, dysplasia) correlated with frequency of detection of *H. pylori* and associated microorganisms of eukaryotic origin (fungi and protozoa of the genus *Candida*).

**Conclusions.** The obtained data indicate a possible role of *H. pylori* and other microorganisms (mainly gram-positive cocci, Gram-negative rods, yeasts) in inflammatory processes of the gastric mucosa. Further studies to confirm the concept on the existence of association of *H. pylori* and gastric microbiota with chronic inflammatory processes are required.

**Keywords:** *gastroduodenal diseases, Helicobacter pylori, microbiota*

**For citation:** Isaeva G.Sh., Vakatova L.V., Efimova N.G., Burkhanov R.R., Valiullina I.R. Gastric microbiota at gastroduodenal tract morphological changes associated with the infection caused by *Helicobacter pylori*. *Bacteriology*. 2017; 2(1): 14–19. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-14-19

Открытие роли *Helicobacter pylori* в патогенезе заболеваний желудка произвело настоящий прорыв в области медицины. Опровержение ранее господствующего мнения о «стерильности» желудка и обнаружение *H. pylori* привели к концептуальному сдвигу в пользу утверждения о возможности колонизации этого биотопа различными микроорганизмами. Последующим шагом в понимании патологических процессов, происходящих в желудке, становятся исследования взаимоотношений между макроорганизмом и микробным сообществом.

Как известно, микрофлора желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) представляет собой сложную экосистему. По данным последних исследований с использованием молекулярно-генетических, протеомных, хромато-масс-спектрометрических методов совокупный геном бактерий, колонизирующих ЖКТ, насчитывает более 400 тыс. генов, что в 12 раз превышает размер генома человека. При этом большинство бактерий относится к некультивируемым формам, что открывает огромную перспективу в изучении «микробиома» и его роли в физиологических и патологических процессах, происходящих в организме человека.

**Цель исследования** – изучение разнообразия микробиоты при различных морфологических изменениях слизистой оболочки желудка у больных с воспалительными заболеваниями гастроудоденального тракта, в том числе ассоциированных с *H. pylori*.

## Материалы и методы

Были обследованы 104 пациента, обратившихся в лечебно-диагностический центр «Фарм-Т» с хроническим гастроудоденитом, эрозивным гастритом, гастроэзофагорефлюксной болезнью желудка. Средний возраст больных – 44 года.

Материалом для исследования служили биоптаты слизистой оболочки желудка (СОЖ) и пищевода, отобранные при проведении диагностической фиброэзофагогастроудоденоскопии. Для изучения морфологических изменений СОЖ и микрофлоры с определением степени ее обсемененности применяли цитологический метод с использованием окраски катионовым синим О (основным) [1] и по Романовскому-Гимзе. Флаконы с материалом доставляли в цитологическую лабораторию сразу же после отбора проб. Из биоптатов СОЖ готовили мазки, равномерно распределяя клеточный материал по предметному стеклу. Фиксацию мазков производили 96% этиловым спиртом в течение 20 минут, после чего окрашивали и микроскопировали.

Для изучения микрофлоры СОЖ и обнаружения *H. pylori* использовали бактериологический и масс-спектрометрический методы.

Отобранные биоптаты помещали в пробирки с 5 мл транспортной тиогликолевой средой и в течение 1–2 часов с момента взятия материала доставляли в лабораторию. В бактериологических исследованиях были использованы питательные среды (колумбийский и эритроцит агары) с добавлением 5% крови. Культивирование проводили при 37 °С в течение 3–5 сут в микроаэрофильных и аэробных условиях. Чашки с посевами помещали в анаэробстат (АЭ-01, Россия), в котором микроаэрофильные условия создавали с помощью специальных газогенерирующих пакетов (Campy Gen, Oxoid, England).

Принадлежность выделенных культур к *H. pylori* подтверждали результатами изучения культуральных, морфологических и биохимических свойств. Колонии, выросшие на чашках, были прозрачные, влажные, блестящие, имели ровную округлую форму и малый размер ( $d \approx 1–2$  мм). В мазках, приготовленных из подозрительных колоний, были обнаружены мелкие грамтрицательные неспорообразующие палочки изогнутой, С-образной формы. Биохимическую активность культур определяли по трем основным тестам: на наличие фермента цитохромоксидазы (OXItest, Erba Lachema, Чехия); на наличие фермента каталазы с использованием 3% перекиси водорода; выявление уреазной активности с использованием жидкой среды с мочевиной по Кристенсену. Биохимический метод включал постановку уреазного теста с биоптатом.

Для окончательной идентификации других микроорганизмов использовали метод MALDI-TOF масс-спектрометрии с помощью «Microflex Maldi-ToF» (Bruker, Germany). Для проведения масс-спектрометрического анализа подозрительную колонию наносили на чип, затем покрывали матрицей (α-циано-4-гидроксикоричной кислоты). Идентификацию образцов проводили в режиме реального времени, для чего чип помещали в камеру масс-анализатора и снимали исходные спектры образцов.

## Результаты и обсуждение

При исследовании морфологических изменений СОЖ больных хроническими заболеваниями желудка выявили: пролиферацию покровно-ямочного эпителия в 25% случаев, гиперплазию – в 1%, атрофию – в 5,8%, кишечную метаплазию – в 57,7%, дисплазию – в 10,8% случаев (рис. 1).

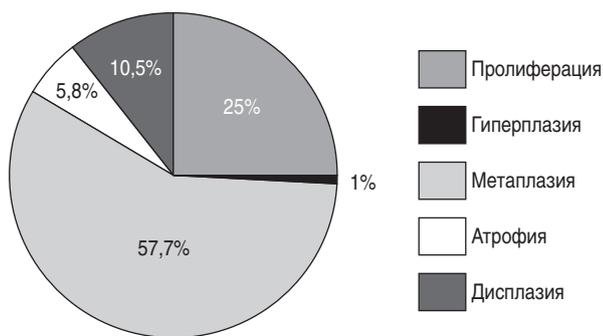


Рис. 1. Структура морфологических изменений слизистой оболочки желудка больных хроническими заболеваниями желудка.

В результате анализа микробного состава желудка была обнаружена смешанная микрофлора, представленная *H. pylori* в 100 случаях ( $96,15 \pm 1,9\%$ ) (рис. 2, 3), кокками – в 18 случаях ( $18,27 \pm 3,8\%$ ) (рис. 4), грибами рода *Candida* – в 65 случаях ( $65,38 \pm 4,7\%$ ) (рис. 5), палочковидными бактериями – в 2 случаях ( $2 \pm 1,4\%$ ), простейшими (цисты лямблий, вегетативные формы) – в 49 случаях ( $49 \pm 4,9\%$ ), смешанной микрофлорой – в 9 случаях ( $9 \pm 2,9\%$ ).

Изучение микробного пейзажа при различных морфологических изменениях СОЖ показало наличие ассоциации между патологическими изменениями и микробной колонизацией. Данные представлены в таблице.

Бактериологическим методом *H. pylori* выделен в 37% случаев, при цитологическом исследовании обнаружен в 96,1% случаев. Микробный пейзаж желудка пациентов, изученный с помощью масс-спектрометрии, был представлен следующими видами: *Actinomyces sp.*, *Arthrobacter polychromogenes*, *Arthrobacter scleromae*, *Bacillus mojavensis*, *B. licheniformis*, *Candida sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Corynebacterium durum*, *Helicobacter pylori*, *Kocuriarosea*, *Lactobacillus sp.*, *Mycoplasma*, *Neisseria flavescens*, *N. perflava*, *N. subflava*, *Pseudomonas sp.*, *Rothia mucilaginosa*, *R. nasimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staph. hominis*, *Staph. warneri*, *Streptococcus pneumoniae*, *Str. salivarius*, *Str. dysgalactiae*, *Streptomyces griseus*, *Thauera sp.*

При исследовании биоптатов пищевода ( $n = 50$ ) микробный пейзаж был менее разнообразен по сравнению с СОЖ. Была обнаружена смешанная микрофлора, представленная кокками – в 11 случаях (22%), грибами рода *Candida* – в 39 случаях (78%), палочковидными бактериями – в 7 случаях (14%), простейшими – в 12 случаях (24%), фузобактериями – в 3 случаях (6%). Среди микроорганизмов, колонизирующих пищевод, масс-спектрометрическим методом выявлены условно-патогенные бактерии рода *Neisseria*, *Gemella* и вида *Rothia mucilaginosa*.

Как известно, микробиота пищевода отличается низким филогенетическим разнообразием. По литературным данным, у здоровых людей постоянная микрофлора, колонизирующая слизистую оболочку пищевода, представлена преимущественно грамположительными факультативными анаэробами: стрептококками и лактобациллами, происходящими преимущественно из ротовой полости [2]. Восемь родов (*Streptococcus*, *Prevotella*, *Actinomyces*, *Gemella*, *Rothia*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Vellonella*) обнаружены A.F.Andersson и соавт. (2008) с помощью пиросеквенирова-

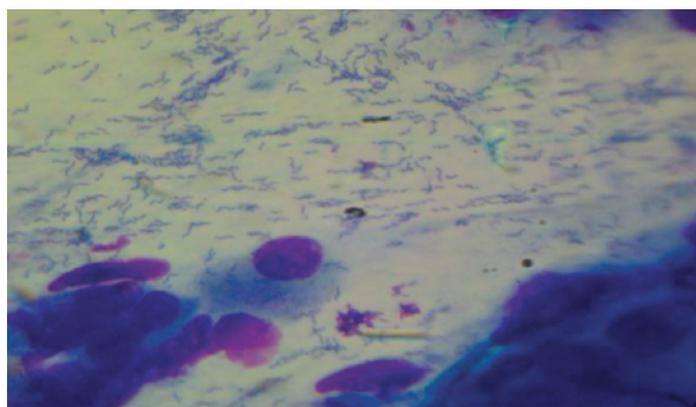


Рис. 2. *Helicobacter pylori* в высокой степени обсемененности. Покровно-ямочный эпителий желудка. Окрашивание по Романовскому-Гимзе. Ув.  $\times 1000$ .

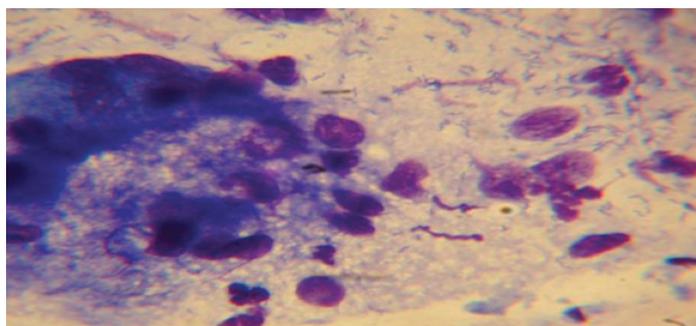


Рис. 3. Пролиферация покровно-ямочного эпителия желудка. *Helicobacter pylori* в умеренной степени обсемененности. Окраска по Романовскому-Гимзе. Ув.  $\times 1000$ .

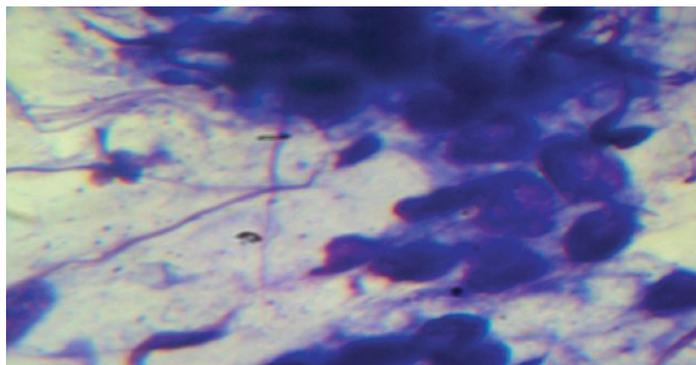


Рис. 4. Пласты покровно-ямочного эпителия пилорического отдела желудка. Кокковая флора. Окрашивание по Романовскому. Ув.  $\times 1000$ .

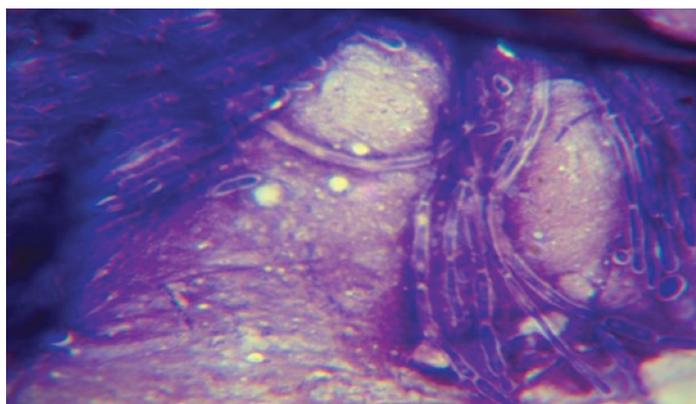


Рис. 5. Грибы рода *Candida* в слизистой оболочке желудка. Окраска катионовым синим О. Ув.  $8 \times 90$ .

Таблица. Ассоциация морфологических изменений СОЖ с колонизацией различными микроорганизмами у *H. pylori*-позитивных больных

Микроорганизм	Морфологические изменения, n (%)					Всего n = 100, n (%)
	пролиферация	гиперплазия	метаплазия	атрофия	дисплазия	
<i>H. pylori</i>	23	1	59	6	11	100 (100)
Кокки	8 (34,8)		8 (13,6)	1 (16,6)	1 (9,1)	18 (18 ± 3,8)
Палочковидные			2 (3,4)			2 (2 ± 1,4)
Грибы рода <i>Candida</i>	11 (47,8)	1	45 (76,3)	2 (33,3)	6 (54,5)	65 (65 ± 4,8)
Цисты простейших типа амёбы	16 (69,6)	1	22 (37,3)	5 (83,3)	5 (45,5)	49 (49 ± 4,9)
Смешанная флора	3 (13)		6 (10,2)			9 (9 ± 2,9)

ния в биоматериале из глотки и пищевода [3]. В проведенном нами исследовании в биоптатах пищевода были идентифицированы условно-патогенные бактерии, принадлежащие к родам *Neisseria*, *Gemella* и виду *Rothia mucilaginosa*. По данным современных исследований, эти микроорганизмы часто обнаруживаются в ротовой полости и верхних дыхательных путях здоровых людей, считаются слабо вирулентными и не играют большой роли в патологии человека. Они описаны в качестве этиологического фактора заболеваний (пневмонии, менингиты, септические инфекции и других) преимущественно у пациентов с иммунодефицитными состояниями.

Микробиота желудка, в сравнении с пищеводом, отличается большим разнообразием. Известно, что в 1 мл желудочного сока здорового человека содержится  $10^2$ – $10^4$  клеток культивируемых микроорганизмов. За счет высокой кислотности (натощак среднее значение pH равно 1,5–2,0), воздействия протеолитических ферментов, быстрой моторно-эвакуационной функции создаются относительно неблагоприятные условия для размножения бактерий. Результаты бактериологических исследований показывают, что желудочная микробиота состоит из преимущественно резидентных представителей биотопов респираторного тракта, ротовой полости, пищевода и тонкого кишечника. У здоровых людей из СОЖ наиболее часто выделяются бактерии родов *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Clostridium* [4]. Также из желудка изолируют бактерии родов *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* [5]. Результаты, полученные при исследовании микробиоты желудка здоровых людей, указывают на наличие зависимости между отсутствием воспалительных процессов и обнаружением лактобактерий, обладающих пробиотической активностью [6, 7].

Противохеликобактерная активность нормальных комменсалов желудка подтверждается последними исследованиями, проведенными *in vivo* и *in vitro*. Так, на животных моделях выявлено ингибирующее действие трех видов лактобактерий *L. johnsonii*, *L. murinus* и *L. reuteri* на *H. pylori* [8]. Антимикробная активность также подтверждена у *Lactobacillus reuteri*, выделенной из биоптатов желудка и желудочного сока здоровых пациентов [9]. Кроме того, выявлена способность ингибирования роста *H. pylori* и предотвращение его перехода из спиральной в кокковидную форму *Streptococcus mitis* – представителя нормальной микробиоты желудка [10].

В настоящее время установлено, что более 80% микроорганизмов, колонизирующих желудок, относится к некультивируемым формам, в связи с чем, несмотря на высокую специфичность, чувствительность бактериологического метода невысока, что ограничивает использование этого метода для более полного изучения микробного сообщества

биотопов. В настоящее время методы геномного и протеомного анализа позволяют значительно расширить наши представления о составе микробиоты. Так, в исследовании, проведенном Е.М.Вик и соавт. (2006), среди бактериальных популяций, колонизирующих желудок, было выявлено более 130 семейств 13 типов, из которых доминирующими являлись представители *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* [11]. 67% идентифицированных генотипов были обнаружены ранее в образцах из ротовой полости, и, таким образом, имели оральное происхождение. Но последние исследования указывают на то, что микробиота желудка здоровых людей отличается по составу от микробиоты верхних отделов пищеварительного тракта (ротовой полости, глотки, пищевода) с доминированием представителей *Actinobacteria*, *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* [5].

В проведенном нами исследовании состава микрофлоры в группах больных, инфицированных и не инфицированных *H. pylori*, были выявлены некоторые закономерности, требующие дополнительного подтверждения при проведении дальнейших исследований на группах здоровых добровольцев. В группе *H. pylori*-негативных пациентов видовой состав микробиоты отличался большим видовым разнообразием. В то же время в обеих группах были обнаружены бактерии следующих родов: *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rothia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*. Только в группе *Helicobacter*-положительных пациентов обнаружены грибы *Candida*, *Colletotrichum*, бактерии родов *Thauera*, *Mycoplasma*. При всем разнообразии представленной бактериальной флоры были выявлены популяции преимущественно назоофарингеального происхождения. По результатам ранее проведенных исследований установлено, что при хронических заболеваниях гастродуоденального тракта выявляется смешанная микрофлора не только орофарингеального происхождения – источником колонизации желудка может быть дуоденогенный путь инфицирования, на что указывает выявление при цитологическом изучении биоптатов СОЖ лямблий, кишечных амёб [12].

Данные о влиянии *H. pylori* на состав микрофлоры гастродуоденальной зоны отличаются противоречивостью. По некоторым данным у *H. pylori*-негативных пациентов отмечено большее филогенетическое разнообразие микрофлоры. А.Ф.Андерссон и соавт. (2008) при отсутствии *H. pylori* обнаружили более 260 видов микроорганизмов, относящихся к 33 родам, в то время как у *H. pylori*-позитивных было выявлено тотальное доминирование этого микроорганизма, достигающее до 93–97% от всего видового состава [3]. По другим данным, у лиц, не инфицированных *H. pylori*, наиболее часто встречались бактерии родов *Proteobacteria*, *Streptococcus*,

*Prevotella* [13]. A. Maldonado-Contreras и соавт. (2011) методом секвенирования по гену 16S РНК проанализировали состав желудочной микробиоты в зависимости от инфицирования *H. pylori*. У пациентов, инфицированных *H. pylori*, преобладали представители протеобактерий и ацидобактерий, тогда как у неинфицированных – актинобактерии и представители *Fermicutes* (грамположительных) [14]. Другие исследования свидетельствуют об обратном. При исследовании 215 малазийских пациентов не обнаружено влияния *H. pylori* на микробное разнообразие [15]. Бактериологическое и молекулярно-генетическое исследование биоптатов желудка, отобранных от 29 здоровых добровольцев, не выявили достоверных отличий в составе желудочной микробиоты в зависимости от *H. pylori* статуса [5]. Противоречивость данных может объясняться наличием географических различий в разнообразии микробиоты, обусловленных не только влиянием *H. pylori*, но и других факторов (социально-гигиенических, пищевых, генетических и т.д.).

Установлению возможной роли микробиоты, отличной от *H. pylori*, в канцерогенезе СОЖ посвящен ряд последних исследований [16–18]. Одним из патогенетических механизмов участия микробиоты в развитии рака желудка может служить избыточный рост нитратредуцирующих бактерий, вызывающих накопление эндогенных N-нитрозокомпонентов (N-нитрозаминов и N-нитрозоамидов), являющихся потенциальными канцерогенами. Как известно, нитриты являются прекурсорами нитрозокомпонентов, а бактериальные цитохромнитратредуктазы катализируют превращение нитритов в нитрозамины в присутствии вторичных аминов. Множество бактерий имеют данный фермент, но наибольшей нитратредуктазной активностью обладают вейлонеллы и гемофилы. В исследовании, проведенном J.Dicksved и соавт. (2009), были получены данные о доминировании в составе желудочной микрофлоры у больных раком желудка бактерий родов *Veillonella* и *Haemophilus*, наряду с колонизацией бактериями из родов *Streptococci*, *Lactobacillus*, *Prevotella* и *Neisseria* [16]. Некоторые представители микробиоты (обсуждается участие бактерий родов *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Haemophilus*) как постоянный источник воспаления и стимуляции пролиферативной активности клеток эпителия могут являться потенциальным фактором риска малигнизации, но для подтверждения данной гипотезы необходимы длительные многоцентровые исследования.

Проведенное нами изучение микробного пейзажа показало наличие связи между присутствием *H. pylori* и морфологическими изменениями, при этом в большинстве случаев пролиферация СОЖ, кишечная метаплазия и дисплазия чаще ассоциированы с микст-инфицированием *H. pylori*, грибами рода *Candida* и простейшими ( $p < 0,05$ ). Обнаружение доминирования эукариотов (грибов рода *Candida* и простейших) при начальных стадиях воспалительного процесса и при предраковых состояниях (атрофия, кишечная метаплазия, дисплазия) позволяет сделать предположение о возможном участии или синергетическом воздействии *H. pylori* и эукариотической микрофлоры на патологический процесс последовательных превращений в СОЖ, ведущих к канцерогенезу. Как известно, цепь переходов от начальной стадии воспаления от пролиферации и гиперплазии к стадиям предраковой трансформации – атрофии, кишечной метаплазии и

дисплазии – возможно обратить вспять при проведении адекватного лечения, в том числе при достижении эрадикации *H. pylori*. Но полученные первоначальные данные позволяют предположить возможность использования комбинирования противохеликобактерной терапии с потивопротозойными и антифунгицидными препаратами, дополненного в дальнейшем пробиотиками, для коррекции дисбиотических нарушений микробиоты в комплексном лечении поражений желудка.

## Выводы

Проведенное исследование указывает на наличие разнообразия микробиоты желудка, представленной прокариотической и эукариотической микрофлорой, у больных с хроническими заболеваниями гастродуоденальной зоны. Выявлено доминирование *H. pylori* в слизистой оболочке желудка с некоторым снижением видового разнообразия условно-патогенной микрофлоры у *H. pylori*-позитивных пациентов. Патоморфологические изменения слизистой оболочки желудка коррелируют с микробной колонизацией. При этом тяжесть морфологических изменений (атрофия, кишечная метаплазия, дисплазия) СОЖ находится в прямой зависимости от частоты обнаружения *H. pylori* и ассоциантов – грибов рода *Candida* и простейших.

## Литература

- Исаева Г.Ш., Ефимова Н.Г., Хайрутдинова Г.Н. Окраска катионовым синим O для цитологического выявления *Helicobacter pylori*. Клиническая лабораторная диагностика. 2009;5:19-20.
- Macfarlane S, Dillon JF. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. 2007;102:1187-96.
- Andersson AF., Lindberg M, Jakobsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. PLoS One. 2008;3(7):e2836. DOI: 10.1371/journal.pone.0002836
- Zilberstein B, Quintanilha AG, Santos MA, Pajeki D, Moura EG, Alves PR, et al. Digestive tract microbiota in healthy volunteers. Clinics (Sao Paulo). 2007;62:47-54.
- Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suárez A, Mayo B. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. Microb Ecol. 2013;65:763-72.
- Ryan KA, Jayaraman T, Daly P, Canchaya C, Curran S, Fang F, et al. Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. Lett Appl Microbiol. 2008;47:269-74.
- Roos S, Engstrand L, Jonsson H. *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55:77-82.
- Zaman C, Osaki T, Hanawa T, Yonezawa H, Kurata S, Kamiya S. Analysis of the microbial ecology between *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota of Mongolian gerbils. J Med Microbiol. 2014;63:129-37. DOI: 10.1099/jmm.0.061135-0
- Delgado S, Leite AM, Ruas-Madiedo P, Mayo B. Probiotic and technological properties of *Lactobacillus* spp. strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. Front Microbiol. 2015;5:766. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00766
- Khosravi Y, Dieye Y, Loke MF, Goh KL, Vadivelu J. *Streptococcus mitis* induces conversion of *Helicobacter pylori* to coccoid cells during co-culture in vitro. PLoS One. 2014;9:e112214. DOI: 10.1371/journal.pone.0112214

11. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:732-37. DOI: 10.1073/pnas.0506655103
12. Исаева ГШ, Ефимова НГ. Желудочный гiardiaz, ассоциированный с *Helicobacter pylori*. Экспериментальная клиническая гастроэнтерология. 2010;6:30-4.
13. Li XX, Wong GL, To KF, Wong VW, Lai LH, Chow DK, et al. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. PLoS One. 2009;4:e7985. DOI: 10.1371/journal.pone.0007985
14. Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, Karaoz U, Contreras M, Blaser MJ, et al. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. ISME J. 2011;(5):574-9. DOI: 10.1038/ismej.2010.149
15. Khosravi Y, Dieye Y, Poh BH, Ng CG, Loke MF, Goh KL, et al. Culturable bacterial microbiota of the stomach of *Helicobacter pylori* positive and negative gastric disease patients. Scientific World Journal. 2014;6:10421. DOI: 10.1155/2014/610421
16. Dicksved J, Lindberg M, Rosenquist M, Enroth H, Jansson JK, Engstrand L. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. J Med Microbiol. 2009;58:509-16. DOI: 10.1099/jmm.0.007302-0
17. Aviles-Jimenez F, Vazquez-Jimenez F, Medrano-Guzman R, Mantilla A, Torres J. Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. Sci Rep. 2014;4:4202. DOI: 10.1038/srep04202
18. Eun CS, Kim BK, Han DS, Song KS, Kim YS, Kim JF, et al. Differences in gastric mucosal microbiota profiling in patients with chronic gastritis, intestinal metaplasia, and gastric cancer using pyrosequencing methods. Helicobacter. 2014 Dec;19(6):407-16. DOI: 10.1111/hel.12145
10. Khosravi Y, Dieye Y, Loke MF, Goh KL, Vadivelu J. *Streptococcus mitis* induces conversion of *Helicobacter pylori* to coccoid cells during co-culture in vitro. PLoS One. 2014;9:e112214. DOI: 10.1371/journal.pone.0112214
11. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:732-37. DOI: 10.1073/pnas.0506655103
12. Isaeva GSh, Efimova NG. Zheludochnyi giardiaz, assotsirovannyi s *Helicobacter pylori*. Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya. 2010;6:30-4. (In Russian).
13. Li XX, Wong GL, To KF, Wong VW, Lai LH, Chow DK, et al. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. PLoS One. 2009;4:e7985. DOI: 10.1371/journal.pone.0007985
14. Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, Karaoz U, Contreras M, Blaser MJ, et al. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. ISME J. 2011;5:574-9. DOI: 10.1038/ismej.2010.149
15. Khosravi Y, Dieye Y, Poh BH, Ng CG, Loke MF, Goh KL, et al. Culturable bacterial microbiota of the stomach of *Helicobacter pylori* positive and negative gastric disease patients. Scientific World Journal. 2014;6:10421. DOI: 10.1155/2014/610421
16. Dicksved J, Lindberg M, Rosenquist M, Enroth H, Jansson JK, Engstrand L. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. J Med Microbiol. 2009;58:509-16. DOI: 10.1099/jmm.0.007302-0
17. Aviles-Jimenez F, Vazquez-Jimenez F, Medrano-Guzman R, Mantilla A, Torres J. Stomach microbiota composition varies between patients with non-atrophic gastritis and patients with intestinal type of gastric cancer. Sci Rep. 2014;4:4202. DOI: 10.1038/srep04202
18. Eun CS, Kim BK, Han DS, Song KS, Kim YS, Kim JF, et al. Differences in gastric mucosal microbiota profiling in patients with chronic gastritis, intestinal metaplasia, and gastric cancer using pyrosequencing methods. Helicobacter. 2014 Dec;19(6):407-16. DOI: 10.1111/hel.12145

## References

1. Isayeva GSh, Yefimova NG, Khairutdinova GN. Cationic blue O staining for the cytological detection of *Helicobacter pylori*. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2009;5:19-20. (In Russian).
2. Macfarlane S, Dillon JF. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. 2007;102:1187-96.
3. Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Bäckhed F, Nyrén P, Engstrand L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. PLoS One. 2008;37:e2836. DOI: 10.1371/journal.pone.0002836
4. Zilberstein B, Quintanilha AG, Santos MA, Pajeci D, Moura EG, Alves PR, et al. Digestive tract microbiota in healthy volunteers. Clinics (Sao Paulo). 2007;62:47-54.
5. Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suárez A, Mayo B. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. Microb Ecol. 2013;65:763-72.
6. Ryan KA, Jayaraman T, Daly P, Canchaya C, Curran S, Fang F, et al. Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. Lett Appl Microbiol. 2008;47:269-74.
7. Roos S, Engstrand L, Jonsson H. *Lactobacillus gastricus sp. nov.*, *Lactobacillus antri sp. nov.*, *Lactobacillus kalixensis sp. nov.* and *Lactobacillus ultunensis sp. nov.*, isolated from human stomach mucosa. Int J Syst Evol Microbiol. 2005;55:77-82.
8. Zaman C, Osaki T, Hanawa T, Yonezawa H, Kurata S, Kamiya S. Analysis of the microbial ecology between *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota of Mongolian gerbils. J Med Microbiol. 2014;63:129-37. DOI: 10.1099/jmm.0.061135-0
9. Delgado S, Leite AM, Ruas-Madiedo P, Mayo B. Probiotic and technological properties of *Lactobacillus spp.* strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. Front Microbiol. 2015;5:766. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00766

## Информация о авторах:

Вакатова Лидия Владимировна, биолог лаборатории бактериологических исследований ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)»  
Адрес: 420061, Казань, ул. Сеченова, 13а  
Телефон: (843) 221-7958

Ефимова Надежда Геннадьевна, врач-цитолог  
ООО «Лечебно-диагностический центр «Фарм-Т»  
Адрес: 420111, Казань, ул. Профсоюзная, 30  
Телефон: (843) 292-0222

Бурханов Ринат Рифкатович, врач-эндоскопист  
ООО «Лечебно-диагностический центр «Фарм-Т»  
Адрес: 420111, Казань, ул. Профсоюзная, 30  
Телефон: (843) 292-0222

Валиуллина Инна Робертовна, врач-бактериолог, руководитель лаборатории клинической бактериологии ГАУЗ «Республиканская клиническая больница» МЗ РТ  
Адрес: 420064, Казань, Оренбургский тракт, 138  
Телефон: (843) 231-2143

## Information about authors:

Lidia V. Vakatova, biologist of laboratory of bacteriological researches Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan  
Address: 13a Sechenov Str., Kazan, 420061, Russian Federation  
Phone: (843) 221-7958

Nadezhda G. Efimova, cytologist of Medical Center «Pharm-T»  
Address: 30 Profsovnaya Str., Kazan, 420111, Russian Federation  
Phone: (843) 292-0222

Rinat R. Burkhanov, endoscopist of Medical Center «Pharm-T»  
Address: 30 Profsovnaya Str., Kazan, 420111, Russian Federation  
Phone: (843) 292-0222

Inna R. Valiullina, bacteriologist, head of department of clinical bacteriology of Republican Clinical Hospital of the Ministry of Healthcare of the Republic of Tatarstan  
Address: 138 Orenburgskii tract, Kazan, 420064, Russian Federation  
Phone: (843) 231-2143

# Комплексные лабораторные исследования на дифтерию на современном этапе

Л.А.Краева<sup>1,4</sup>, Е.А.Алексеева<sup>2</sup>, Г.И.Беспалова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области», Вологда, Российская Федерация;

<sup>3</sup>ФГБОУВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>4</sup>ФГБОУВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Установлены критерии достоверной оценки защищенности населения от дифтерии на основании двух показателей: количества суммарных антитоксических противодифтерийных антител и индекса авидности. Для этого предложено использовать модифицированный вариант иммуноферментного анализа с одновременным определением двух показателей. Выведены формулы расчета вероятности заболевания дифтерией в случае контакта с больным или носителем *Corynebacterium diphtheriae* и определения срока последующей ревакцинации. Разработаны «Алгоритм контроля иммунитета населения и оценки невосприимчивости к дифтерии» и «Алгоритм микробиологического исследования клинического материала на поиск *C. diphtheriae*».

**Ключевые слова:** дифтерия, поствакцинальный иммунитет, токсигенные штаммы

**Для цитирования:** Краева Л.А., Алексеева Е.А., Беспалова Г.И. Комплексные лабораторные исследования на дифтерию на современном этапе. Бактериология. 2017; 2(1): 20–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-20-24

## Comprehensive laboratory studies of diphtheria at the present time

L.A.Kraeva<sup>1,4</sup>, E.A.Alekseeva<sup>2</sup>, G.I.Bespalova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>St.-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russian Federation;

<sup>2</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in Vologda region, Vologda, Russian Federation;

<sup>3</sup>North-Western State Medical University named by I.I.Mechnikov, Saint-Petersburg, Russian Federation;

<sup>4</sup>Military Medical Academy named by S.M.Kirov, Saint-Petersburg, Russian Federation

Reliable assessment criteria of the population protection from diphtheria have been established on the basis of two indexes: the total number of antitoxic antidiphtheria antibodies and the avidity index. For this purpose it was proposed to use a modified version of ELISA with simultaneous determination of two values. Formulas for calculating the probability of diphtheria in case of contact with a sick patient or *Corynebacterium diphtheriae* carrier and for determining the period of subsequent revaccination were deduced. «Immunity control algorithm and evaluation of population immunity to diphtheria» and «algorithm of clinical material microbiological testing to search *C. diphtheriae*» were developed.

**Keywords:** diphtheria, vaccine-induced immunity, toxigenic strains

**For citation:** Kraeva L.A., Alekseeva E.A., Bespalova G.I. Comprehensive laboratory studies of diphtheria at the present time. Bacteriology. 2017; 2(1): 20–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-20-24

**В** настоящее время, спустя более 15 лет после прошедшей эпидемии дифтерии, повсеместно отмечается снижение внимания клиницистов к этой инфекции. Профилактические обследования не проводятся, диагностические проводятся, но не в полном объеме. В то же время, по данным статистического анализа в Санкт-Петербурге и Северо-

Западном регионе в целом, регистрируются случаи носительства *Corynebacterium diphtheriae* и заболевания дифтерией, преимущественно среди лиц из закрытых коллективов. По данным Elek-теста, выделенные штаммы *C. diphtheriae* в основном нетоксигенные. Тем не менее, проведенные исследования с помощью молекулярных методов пока-

### Для корреспонденции:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», профессор кафедры микробиологии ФГБОУВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова»

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

Телефон: (812) 498-0939

E-mail: lykraeva@yandex.ru

Статья поступила 15.11.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

### For correspondence:

Liudmila A. Kraeva, Sc.D., MD, Head of the laboratory of medical bacteriology, St.-Petersburg Pasteur Institute; Professor of Department of Microbiology, Military medical Academy named by S.M.Kirov

Address: 14 Mira Str., Saint-Petersburg, 197101, Russian Federation

Phone: (812) 498-0939

E-mail: lykraeva@yandex.ru

The article was received 15.11.2016, accepted for publication 15.03.2017

зали, что среди таких штаммов до 40% несут в себе «молчащий» *tox+* ген [1, 2]. Несомненно, полимеразная цепная реакция (ПЦР) обладает более высокой чувствительностью и скоростью постановки [3–6]. Однако результат ПЦР свидетельствует о наличии у микроорганизма гена токсигенности, который, как известно, может быть репрессирован и не проявлять себя в фенотипических тестах, таких как Elek-тест. Известно, что при определенных условиях действие гена-супрессора прекращается, и штамм возобновляет способность продуцировать токсин [7].

Более того, в условиях бесконтрольного использования антибиотиков возможно частичное подавление роста и размножения микроорганизмов, попавших на слизистые оболочки, и как следствие – получение отрицательного результата при бактериологическом исследовании из-за временного снижения количества микроорганизмов в месте входных ворот инфекции или низкой активности дифтерийного токсина, которую не всегда удастся выявить с помощью Elek-теста [8]. Таким образом, объективно требуется улучшение качества лабораторной диагностики, направленной на поиск *C. diphtheriae*.

С другой стороны, защищенность от дифтерии, согласно нормативным документам, в нашей стране определяется с помощью реакции прямой гемагглютинации (РПГА) [9, 10]. Однако результат реакции, выражаемый в титрах, не позволяет точно определить количество анитоксических антител (АТ-АТ). Разработка ВОЗ и повсеместное внедрение в практику оценочной шкалы защищенности от дифтерии на основании определения количества АТ-АТ позволили контролировать качество вакцинации [11]. Однако информация о количестве вырабатываемых противодифтерийных антител не всегда дает достоверный ответ на вопрос о степени защищенности от дифтерии. Это было продемонстрировано во время последней эпидемии дифтерии в России и после нее, когда у заболевших (до 40% случаев) находили в крови АТ-АТ защитных уровней [12–14]. Ранее проведенными исследованиями была установлена определяющая роль высокоavidных АТ-АТ в защите от дифтерии, которые могут быть определены наряду с количеством суммарных АТ-АТ в иммуноферментном анализе [15]. При этом была показана динамика формирования и утраты АТ-АТ, равно как и показателя их avidности, изучены особенности специфического иммунитета к дифтерии среди различных групп населения. Тем не менее, отсутствие программ и схем исследования при диагностике дифтерии и изучении напряженности иммунитета у населения, содержащих новые аргументированные данные, не позволяют полноценно и качественно проводить бактериологический и иммунологический контроль в отношении дифтерии на местах.

Поэтому целью работы явилась разработка алгоритмов комплексного лабораторного исследования на дифтерию.

## Материалы и методы

В работе использованы 650 штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в Санкт-Петербурге, Ленинградской и Вологодской областях в 1995–2015 гг., а также 1520 образцов сыворотки крови взрослых лиц. Используются референс-штаммы *C. diphtheriae* № 10356 (*tox-*), №10648 (*tox+*) и №3984 (*tox+/-*) из NCTC (National Collection of Type Cultures Diphtheriae

Reference Laboratory, Central Health Laboratory (CPHL), London, UK).

Реализация поставленной цели достигалась следующими методами: микробиологическими, включая исследования по стандартным методикам, прилагаемым к диагностическим наборам, иммунологическими (иммуноферментный анализ (ИФА), РПГА и реакция нейтрализации (РН) на клетках Vero, полученных из лаборатории детских инфекций ФБУН НИИЭМ им. Пастера, эпидемиологическими (с оценкой характеристики выбранных контингентов), методами математической обработки данных, а также разработанными авторами «Экспресс-способ выявления потенциальной токсигенности у штаммов *C. diphtheriae*» и «Экспресс-способ выявления дифтерийного токсина на основе микротехнологий».

## Результаты и обсуждение

*1. Определение защищенности населения от дифтерии на основе модернизации серологического мониторинга.*

По данным центров Госсанэпиднадзора в Северо-Западном регионе РФ в постэпидемические годы у 50% лиц, заболевших дифтерией, в крови обнаруживали защитные уровни АТ-АТ, выявляемые с помощью регламентированного метода РПГА. В связи с этим были проведены параллельные исследования образцов сыворотки крови от 350 лиц тремя используемыми в нашей стране методами: РН на культуре клеток Vero, РПГА и ИФА.

Полученные результаты показали, что коэффициент корреляции между результатами исследования сывороток в РПГА и классической РН на культуре клеток Vero составил  $r = 0,5$ . Между тем, этот показатель для ИФА и РН (Vero) составил 0,95 с уровнем достоверности  $p < 0,05$ . Результаты ИФА выражали в единицах, соответствующим международным критериям.

В результате исследования образцов сывороток крови заболевших дифтерией лиц с помощью ИФА было установлено, что 29% из них содержали АТ-АТ в количестве  $>0,1$  МЕ/мл, что по международным и национальным критериям обеспечивает невосприимчивость к дифтерии. Поэтому дальнейшие исследования были посвящены изучению качества АТ-АТ и их роли в защите от дифтерии.

Для исследования были выбраны две панели из 185 образцов сывороток крови, полученных от больных дифтерией (на 3–5-й день заболевания, не получавших в этот период лечебной противодифтерийной сыворотки) и контактных лиц, кровь от которых была взята на 1–2-й неделе после контакта с заболевшим дифтерией. Сравнивали не только уровни суммарных АТ-АТ, но и их avidность. При этом среднее значение индекса avidности (ИА) в группе заболевших дифтерией составило 17,5%, а в группе не заболевших дифтерией – 64% (рис. 1).

С помощью математической обработки данных установлено, что ИА более 30% соответствует вероятности защиты от заболевания дифтерией на 95%, а ИА, равный 10%, является показателем критического уровня, ниже которого вероятность заболевания возрастает до 99% ( $p < 0,001$ ).

При помощи математического анализа был выведен комплексный показатель (КП), получаемый из данных о количестве АТ-АТ и ИА, указывающий на вероятность заболевания дифтерией данного обследуемого в случае его кон-

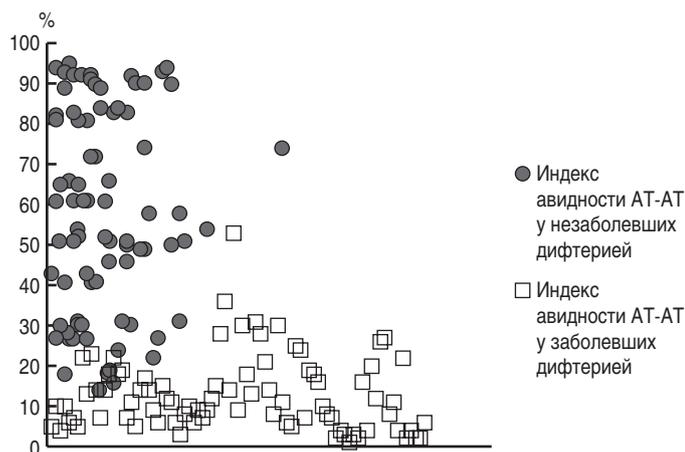


Рис. 1. Результаты определения ИА АТ-АТ в двух группах сывороток.

такта с дифтерийным больным. При этом коэффициент Стьюдента ( $t$ ) = 16,4; достоверность ( $p$ ) < 0,001; коэффициент Фишера ( $F$ ) = 83,7,  $p$  < 0,001.

Наиболее достоверные результаты получены при использовании дискриминантного анализа. При этом степень достоверности выведенных формул была наивысшей ( $p$  = 5,64E-26). В результате примененного статистического анализа выведена формула расчета вероятности заболевания человека дифтерией по двум известным показателям (АТ-АТ и ИА) путем использования их производной – КП. Для этого сначала необходимо рассчитать функцию для лиц, не заболевших дифтерией:

$$y_0 = -3,805 + 0,49 \times \text{КП}, \quad (1)$$

$$\text{где КП} = \text{АТ} - \text{АТ} \times \text{ИА} \quad (2)$$

Затем рассчитывается функция для лиц, заболевших дифтерией:

$$y_1 = -0,713 + 0,017 \times \text{КП} \quad (3)$$

Если значение  $y_1 > y_0$ , то вероятность заболеть дифтерией больше, чем не заболеть. Для расчета вероятности заболевания дифтерией (ВЗд) получена следующая формула:

$$\text{ВЗд} = 0,82 - 0,05 \times \text{КП} \quad (4)$$

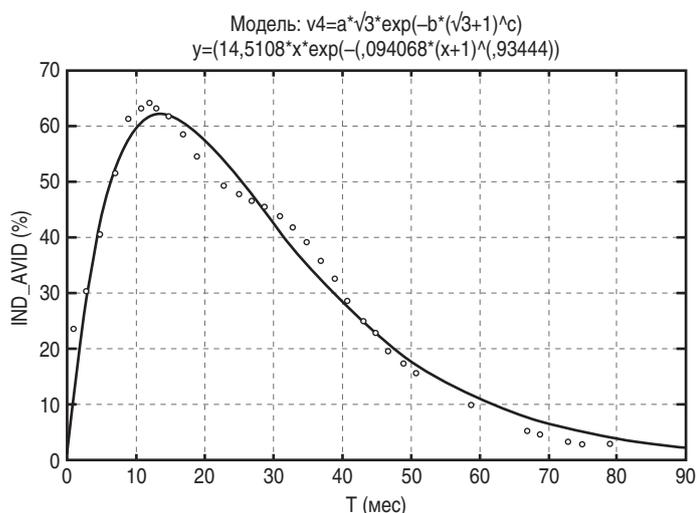


Рис. 2. Математическая модель динамики индексов avidности после ревакцинации. IND\_AVID (%) – индексы avidности (%), T (мес) – время после ревакцинации (месяцы). Средняя погрешность модели = 5%.

Показатель вероятности заболевания может варьировать от 0 до 1: чем выше показатель, тем выше вероятность заболевания.

Поскольку avidность антител, как показано, имеет определяющее значение при оценке защищенности от дифтерии, была установлена динамика их накопления и утраты. При этом созревание высокоavidных антител достигает максимума в среднем через год после ревакцинации, в то время как наибольшее количество суммарных антитоксических антител образуется через 6–9 месяцев. Период регрессии для суммарных антител более длителен, чем для высокоavidных: через 5 лет после очередной ревакцинации индекс avidности антител достигает минимального (критического) уровня (10%), в то время как количественное содержание антитоксических антител остается в пределах защитных уровней (0,1–0,5 МЕ/мл) и снижается до критических значений (0,01 МЕ/мл) к 7–8-му году после ревакцинации.

Поскольку avidность антител, защищающая от заболевания дифтерией, снижается быстрее, чем количественный показатель суммарных антител, то в прогнозе необходимо ориентироваться на индекс avidности антител. Для этого на графике, представляющем собой математическую модель из исходных данных о динамике ИА после ревакцинации (рис. 2), находим значение, наиболее приближенное к полученному ИА антител (с учетом предыдущей вакцинации) и определяем по графику, через сколько месяцев ИА снизится до критической отметки (10%). Очередную ревакцинацию (или повторное исследование) рекомендуется пройти до этой даты.

Кроме того, полученные данные о различиях в защите от дифтерии некоторых социальных и профессиональных групп аргументируют необходимость дифференцированного подхода к отбору лиц для серологического мониторинга и коррекции защищенности от заболевания.

II. Совершенствование лабораторной диагностики по своевременному выявлению токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

Ранее проведенными исследованиями [16] было показано, что низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) индуцирует выработку токсина штаммами *C. diphtheriae*, несущими tox+ ген. При этом наибольший эффект (увеличение в 2 раза) отмечался в отношении тех штаммов, которые имели низкие уровни токсипродукции, т.е. могли остаться неучтенными при визуальной оценке токсигенности в Elek-тесте.

Кроме того, после воздействия НИЛИ на штаммы *C. diphtheriae* с «молчащим» геном, у 45% из 80 штаммов наступало восстановление токсипродукции, регистрируемое в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и Elek-тесте.

Однако определение токсигенности штаммов *C. diphtheriae* с помощью Elek-теста весьма субъективно. Поэтому нами ранее был разработан высокочувствительный способ детекции дифтерийного токсина, основанный на использовании в диагностическом наборе высокоavidных антитоксических противодифтерийных антител и современных микротехнологий [17].

Разработанный экспресс-способ обладает высокой диагностической эффективностью. При количественной оценке чувствительность способа составила 0,001 Лf/мл дифтерийного токсина, что выше показателей любого имеющегося в настоящее время метода детекции дифтерийного токсина.

Из всех фенотипических методов данный способ обладает наилучшими показателями по скорости пробоподготовки, проведения реакции, а также возможности одновременной постановки большого количества проб (рис. 3).

Высокая эффективность предложенных способов и скорость осуществления наряду с низкими финансовыми затратами позволяют широко использовать их как в научных, так и в практических целях.

Результаты статистической обработки данных позволили убедиться в том, что для контроля уровня иммунитета к дифтерии целесообразней использовать метод ИФА вместо РПГА, что соответствует международным стандартам. Показатель ИА АТ-АТ имеет большую достоверность (99%), чем уровень суммарных АТ-АТ (71%) при оценке защищенности от дифтерии, что объясняет, почему отмечались случаи заболевания дифтерией среди лиц, имеющих в крови защитные уровни суммарных антител. Однако наибольшую достоверность при оценке защищенности от дифтерии имеет КП. Поэтому в инструкцию по применению отечественной тест-системы включены дополнения по методике определения ИА антител.

Более того, использование современного математического аппарата позволило разработать методику определения сроков последующей ревакцинации обследуемого. При отсутствии данных о защищенности отдельных лиц необходимо отталкиваться от следующей общей тенденции. К 7–8 году после очередной ревакцинации уровень противодифтерийных АТ-АТ снижается до самых низких защитных значений, в то время как ИА антител снижается до нижнего «порогового» уровня уже через 5 лет. Поэтому в эти сроки необходимо проводить и контроль популяционного иммунитета, и планировать очередную ревакцинацию среди незащищенных лиц.

Выявление групп «риска» среди населения позволило сделать вывод о необходимости проведения периодических профилактических обследований среди лиц старше 50 лет, медицинских работников, рабочих промышленных предприятий с вредными условиями труда. Более того, выявление носителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в психоневрологических интернатах говорит о целесообразности регулярных обследований контингентов в закрытых коллективах, например, 2 раза в год, для предотвращения циркуляции возбудителя и контроля защищенности от дифтерии вновь поступивших лиц.

В результате проведенных исследований был разработан следующий алгоритм контроля иммунитета населения и оценки невосприимчивости к дифтерии как отдельных лиц, так и коллективов по этапам.

1. Отбор крови, заполнение анкеты в БД (возраст, прививочный статус, профессия, хроническое заболевание, дата заболевания).

2. Определение АТ-АТ и ИА.

3. Определение вероятности заболевания по формулам.

4. Определение сроков ревакцинации или повторного контроля иммунитета.

Считаем обоснованным в периоды подъемов уровней заболеваемости ЛОР-органов всех диагностических больных обследовать на дифтерию. Нетоксигенные по данным Elek-теста штаммы *C. diphtheriae* необходимо контролировать с помощью ПЦР на предмет наличия «молчащего» гена токсигенности.

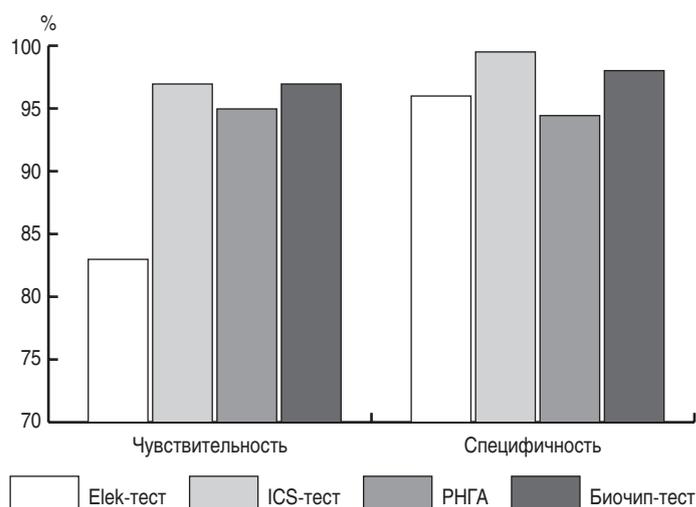


Рис. 3. Сравнение диагностической эффективности различных методов определения токсигенности у штаммов *C. diphtheriae*.

генности. Источники штаммов с «молчащим» геном необходимо обследовать клинически и эпидемиологически и проводить санацию.

Разработка способа усиления токсинопродукции штамма *C. diphtheriae* и высокочувствительного экспресс-способа выявления дифтерийного токсина позволили создать алгоритм микробиологического исследования клинического материала на поиск *C. diphtheriae* по следующим этапам.

1. Выделение из клинического материала коринебактерий. Определение вида и биохимического варианта.

2. Определение токсигенности с помощью Elek-теста. Определение токсигенности в ПЦР.

3. Если штамм не имеет *tox+* гена, то выдается окончательный отрицательный ответ. Если же штамм имеет *tox+* ген, то его нужно простимулировать с помощью НИЛИ.

4. Повторное определение токсигенности в микрочиповом тесте и выдача окончательного ответа по результатам теста.

## Литература

- Краева ЛА, Ценева ГЯ. Особенности биологических свойств *C. diphtheriae*, циркулирующих в постэпидемический период. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009;3:3-6.
- Щедеркина ЕЕ. Основные патогенные свойства *C. diphtheriae* и усовершенствование лабораторной диагностики дифтерийной инфекции. Дисс. ... канд. мед. наук. СПб., 2001, 132 с.
- Ценева ГЯ, Щедеркина ЕЕ. Применение полимеразной цепной реакции в диагностике дифтерийной инфекции. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2000;5:72-4.
- Aravena-Roman M, Bowman R, O'Neill G. Polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. Pathol. 1995;27:71-3.
- Mikhailovich VM, Melnikov VG, Mazurova IK. Application of PCR for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994. J Clin Microbiol. 1995;33:3061-3.
- Pallen MJ, Hay AJ, Puckey LH. Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin. J Clin Pathol. 1994;47:353-6.
- Cianciotto NP, Groman NB. Characterization of bacteriophages from tox-containing, non-toxigenic isolates of *Corinebacterium diphtheriae*. Microbial Pathog. 1997;22:343-51.

8. Ценева ГЯ, Краева ЛА, Габриелян СА, Щедекина ЕЕ. Методы определения токсигенности у штаммов *C. diphtheriae*. Бюллетень ВШЦ СО РАМН. 2005;7:182-6.
9. МУ 3.1.2943-11.3.1. Профилактика инфекционных болезней. Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В). Методические указания (утв. Роспотребнадзором 15.07.2011).
10. Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика дифтерии. СП 3.1.2.1108-02».
11. Efstratiou A, Maple PAC. Manual for the laboratory diagnosis of diphtheria. Copenhagen. The Expanded Programme on Immunization in the European Region of WHO, 1994 (ICP/EPI038).
12. Васильев КГ, Савчук АИ. Клинико-эпидемиологические аспекты вакцинации против дифтерии. Первый конгресс педиатров-инфекционистов России. М., 2002.
13. Матохина АГ. Исследование специфического иммунитета у больных дифтерией. VI Российский съезд врачей-инфекционистов. СПб., 2003.
14. Харченко ГА, Чанпалова ЛС, Харченко ОГ. Дифтерия у привитых детей. VI Российский съезд врачей-инфекционистов. СПб., 2003, 413-4.
15. Краева ЛА, Ценева ГЯ, Николаева АМ, Алексеева ЕА. Роль высокоavidных антитоксических антител в оценке невосприимчивости к дифтерийной инфекции. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2011;4:27-31.
16. Краева ЛА, Ценева ГЯ, Сбойчаков ВБ, Беспалова ГИ. Способ ускоренного определения токсигенности *C. diphtheriae*. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2010;4(32)144-7.
17. Краева ЛА, Зимина ТМ, Ценева ГЯ, Соловьев АВ. Микротехнологии в экспресс-диагностике токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011;2:62-6.
8. Tseneva GYa, Krayeva LA, Gabrielyan SA, Shchederkina EE. Methods for the detection of diphtheria toxin amongst isolates of *C. diphtheriae*. Bulletin of the East Siberian scientific center of the academy of medical sciences. 2005;7:182-6. (In Russian).
9. MU 3.1.2943-11.3.1. Prevention of infectious diseases. Organizing and conducting serological monitoring of the status of collective immunity to infections, managed by means of specific prophylaxis. Guidelines (approved Rospotrebnadzor 15.07.2011). (In Russian).
10. Sanitary-epidemiological regulations "Prevention of diphtheria. SP 3.1.2.1108-02". (In Russian).
11. Efstratiou A, Maple PAC. Manual for the laboratory diagnosis of diphtheria. Copenhagen. The Expanded Programme on Immunization in the European Region of WHO, 1994 (ICP/EPI038).
12. Vasil'ev KG, Savchuk AI. Kliniko-epidemiologicheskie aspekty vaksinatсии protiv difterii [Clinical and epidemiological aspects of vaccination against diphtheria]. The first Congress of paediatric infectious diseases in Russia. Moscow, 2002. (In Russian).
13. Matokhina AG. Issledovanie spetsificheskogo immuniteta u bol'nykh difteriei [Study of specific immunity in patients with diphtheria]. VI Russian Congress of infectiologists. Saint Petersburg, 2003. (In Russian).
14. Kharchenko GA, Chanpalova LS, Kharchenko OG. Difteriya u privitykh detei [Diphtheria in vaccinated children]. VI Rossiiskii s'ezd vrachei-infektsionistov. Saint Petersburg, 2003, pp. 413-4. (In Russian).
15. Krayeva LA, Tseneva GYa, Nikolayeva AM, Alekseyeva EA. Role of highly avid antitoxic antibodies in the estimation of insusceptibility to diphtheria infection. Epidemiology and Infectious Diseases. 2011;4:27-31. (In Russian).
16. Kraeva LA, Tseneva GYa, Sboychakov VB, Bepalova GI. Assay for rapid detection of *Corynebacterium diphtheriae* toxin production. Vestnik Rossiiskoi Voenno-meditsinskoi akademii. 2010;4(32)144-7. (In Russian).
17. Kraeva LA, Zimina TM, Tseneva GYa, Solovyev AV. Micro technologies in express diagnostics of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2011;2:62-6. (In Russian).

## References

1. Kraeva LA, Tseneva GYa. Features of biologic characteristics of corynebacterium diphtheriae circulating in postepidemic period. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2009;3:3-6. (In Russian).
2. Shchederkina EE. Osnovnyye patogennyye svoystva *C. diphtheriae* i usovershenstvovanie laboratornoi diagnostiki differiinoi infektsii [The main pathogenic properties of *C. diphtheriae* and the improvement of laboratory diagnosis of diphtheria infection]. Dissertation. Saint Petersburg, 2001, 132 p. (In Russian).
3. Tseneva GYa, Shchederkina EE. Use of polymerase chain reaction in the diagnostics of diphtheria infection. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2000;5:72-4. (In Russian).
4. Aravena-Roman M, Bowman R, O'Neill G. Polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. Pathol. 1995;27:71-3.
5. Mikhailovich VM, Melnikov VG, Mazurova IK. Application of PCR for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994. J Clin Microbiol. 1995;33:3061-3.
6. Pallen MJ, Hay AJ, Puckey LH. Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin. J Clin Pathol. 1994;47:353-6.
7. Cianciotto NP, Groman NB. Characterization of bacteriophages from tox-containing, non-toxigenic isolates of *Corinebacterium diphtheriae*. Microbial Pathog. 1997;22:343-51.

### Информация о авторах:

Алексеева Елена Андреевна, кандидат медицинских наук, заведующая микробиологической лабораторией ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области»  
 Адрес: 160012, Вологда, ул. Яшина, 1а  
 Телефон: (8172) 75-5031  
 E-mail: elenaalekseeva182@rambler.ru

Беспалова Галина Ивановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской микробиологии ФГБОУВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова»  
 Адрес: 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41  
 Телефон: (812) 275-1904  
 E-mail: natalya.kolyanova@szgmu.ru

### Information about authors:

Elena A. Alekseeva, PhD in Medical sciences, Head of microbiological laboratory, Center of Hygiene and Epidemiology in Vologda region  
 Address: 1a Yashina Str., 160012, Vologda, Russian Federation  
 Phone: (8172) 75-5031  
 E-mail: elenaalekseeva182@rambler.ru

Galina I. Bepalova, PhD in Biological sciences, Associate Professor of Department of medical Microbiology, North-Western State Medical University named by I.I.Mechnikov  
 Address: 41 Kirochnaya Str., Saint-Petersburg, 191015, Russian Federation  
 Phone: (812) 275-1904  
 E-mail: natalya.kolyanova@szgmu.ru

# Лекарственно-устойчивый туберкулез: перспективы ускоренной диагностики и химиотерапии

Л.Н.Черноусова<sup>1</sup>, С.Н.Андреевская<sup>1</sup>, Т.Г.Смирнова<sup>1</sup>,  
Е.Е.Ларионова<sup>1</sup>, О.И.Ивахненко<sup>2</sup>, Е.А.Новоселова<sup>2</sup>, Н.А.Шевкун<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», Москва, Российская Федерация

Обзор посвящен вопросам диагностики и терапии туберкулеза, вызываемого штаммами с множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Описаны основные применяемые в России технологии ускоренной диагностики лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, основанные на выявлении точечных мутаций в геноме. Приводятся сведения о разработке новых противотуберкулезных препаратов, представляющих собой как модификации существующих препаратов, так и новые классы лекарственных средств, эффективных в отношении лекарственно-устойчивых форм туберкулеза. Большое внимание в обзоре уделено отечественным разработкам диагностических тест-систем и новых противотуберкулезных препаратов.

**Ключевые слова:** микобактерии туберкулеза, туберкулез с множественной/широкой лекарственной устойчивостью, молекулярно-генетические методы диагностики, противотуберкулезные препараты

**Для цитирования:** Черноусова Л.Н., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Ивахненко О.И., Новоселова Е.А., Шевкун Н.А. Лекарственно-устойчивый туберкулез: перспективы ускоренной диагностики и химиотерапии. Бактериология. 2017; 2(1): 25–34. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-25-34

## Drug-resistant tuberculosis: the prospects for accelerated diagnostics and chemotherapy

L.N.Chernousova<sup>1</sup>, S.N.Andreevskaya<sup>1</sup>, T.G.Smirnova<sup>1</sup>,  
E.E.Larionova<sup>1</sup>, O.I.Ivakhnenko<sup>2</sup>, E.A.Novoselova<sup>2</sup>, N.A.Shevkun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>NEARMEDIC PLUS LLC, Moscow, Russian Federation

The review summarizes trends in the diagnostic and treatment of M/XDR-TB. The review describes the main accelerated drug-susceptibility testing technologies, based on the identification of point mutations in the genome of *Mycobacterium tuberculosis*. Data on the development of new anti-TB drugs are presented: modifications of existing drugs and new classes effective against drug-resistant forms of tuberculosis. A special attention was given to development of molecular genetic test systems for diagnosis and antibiotic resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis* and new anti-TB drugs in Russia.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, multi- or extensively drug-resistant TB, molecular genetic methods, anti-tuberculosis drugs

**For citation:** Chernousova L.N., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Larionova E.E., Ivakhnenko O.I., Novoselova E.A., Shevkun N.A. Drug-resistant tuberculosis: the prospects for accelerated diagnostics and chemotherapy. Bacteriology. 2017; 2(1): 25–34. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-25-34

**Н**аиболее значимой проблемой для противотуберкулезной службы Российской Федерации (РФ) является туберкулез с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ, ШЛУ ТБ). По оценкам ВОЗ, на долю РФ, вместе с Китаем и Индией, приходится более половины случаев МЛУ ТБ в мире [1]. В России за период 2004–2014 гг. на фоне снижения заболеваемости (с 83,3 до 59,5 случаев

на 100 тыс. населения) и распространенности ТБ (с 218,3 до 137,3 случаев на 100 тыс. населения), распространенность МЛУ ТБ за этот же период возросла почти в 2 раза (с 14,2 до 24,8 на 100 тыс. населения) [2, 3].

По данным ВОЗ, РФ входит в число стран, в которых, помимо МЛУ ТБ, распространен и ШЛУ ТБ, при котором возбудитель устойчив, кроме изониазида и рифампицина, к лю-

### Для корреспонденции:

Черноусова Лариса Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом микробиологии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»

Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, 2

Телефон: (499) 785-9091

E-mail: lchernousova@mail.ru

Статья поступила 17.11.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

### For correspondence:

Larisa N. Chernousova, Sc.D., Professor, Head of the Microbiology department Central TB Research Institute

Address: 2, Yauzskaya alley, Moscow, 107564, Russian Federation

Phone: (499) 785-9091

E-mail: lchernousova@mail.ru

The article was received 17.11.2016, accepted for publication 15.03.2017

бому препарату из группы фторхинолонов и к одному из инъекционных препаратов (амикацину/канамицину и/или капреомицину), независимо от наличия устойчивости к другим противотуберкулезным препаратам (ПТП). Исходя из данных ежегодного государственного статистического наблюдения (форма №33 «Сведения о больных туберкулезом») и учитывая, что, по оценкам ВОЗ, распространенность ШЛУ ТБ составляет 9,6% от контингента пациентов с МЛУ ТБ [1], были получены расчетные данные по числу случаев ШЛУ ТБ в РФ, позволяющие оценить динамику распространенности этой формы ТБ в РФ. Было показано, что за период с 2009 по 2013 гг. число случаев с ШЛУ ТБ увеличилось с 2786 до 3339, то есть за 5 лет возросло почти на 20%. Таким образом, можно констатировать эпидемический характер распространения лекарственно-устойчивого (ЛУ) ТБ в РФ. Согласно оценкам ВОЗ, во всем мире в 2013 г. МЛУ ТБ был выявлен среди 3,5% новых и 20,5% ранее леченых случаев ТБ. Таким образом, в 2013 г. развитие МЛУ ТБ было выявлено примерно у 480 тыс. человек. В среднем, примерно у 9,0% пациентов с МЛУ ТБ был выявлен ШЛУ ТБ [1].

Основными причинами роста ЛУ ТБ, с клинической точки зрения, являются поздняя диагностика лекарственной устойчивости возбудителя, неадекватное или незавершенное предыдущее лечение, использование некачественных противотуберкулезных препаратов, а также перерывы в лечении, временные отмены того или иного препарата и несоблюдение сроков химиотерапии [4].

Серьезной проблемой для фтизиатрической службы РФ также являются дефекты этиологической диагностики: только у четверти впервые выявленных бактериовыделителей, вследствие плохой оснащенности лабораторий, наличие МБТ в диагностическом материале было определено культуральным методом, что означает, что у 3/4 впервые выявленных бактериовыделителей отсутствует возможность определения лекарственной чувствительности возбудителя, и, следовательно, таких пациентов лечат без определения чувствительности к ПТП [5]. Эмпирическое назначение стандартной комбинации химиопрепаратов первого ряда в случае первичной МЛУ приводит к усилению резистентности и ее более широкому распространению [6].

Распространение МБТ с М/ШЛУ существенно снижает эффективность противотуберкулезной терапии, способствует увеличению показателей смертности от ТБ и увеличивает социально-экономическое бремя как для системы здравоохранения, так и для государства в целом. Лечение пациентов с МЛУ ТБ проводится комбинацией из 6 ПТП не менее 3 мес в интенсивной фазе лечения и не менее 12 мес в фазе продолжения, при этом эффективность терапии МЛУ ТБ в РФ составляет приблизительно 37% (47,5% в мире), а затраты на фармакотерапию в расчете на одного пациента в среднем составляют 440 тыс. руб. (для сравнения – затраты на лечение одного пациента с чувствительным ТБ – 2745 руб., а эффективность лечения 69% (86% в мире)) [7–9]. С одной стороны, возможности терапии пациентов с ШЛУ ТБ еще более ограничены вследствие отсутствия альтернатив для составления эффективных схем лечения. С другой стороны, лечение ШЛУ ТБ сопряжено с высокой стоимостью курса лечения: в расчете на одного пациента в среднем затраты на противотуберкулезную

терапию достигают 1,8 млн руб. [8]. Все это приводит к низкой эффективности терапии (26%) и высокому уровню смертности (около 20%) [7].

По данным ЦНИИОИЗ, при условии сохранения существующей тенденции заболеваемости и смертности от ТБ до 2020 г. потери ВВП страны составят не менее 3,5 млрд долларов. По мнению экспертного сообщества, глобальную эпидемию М/ШЛУ ТБ можно остановить только с использованием системного подхода, направленного на совершенствование выявления и терапии этих форм туберкулеза [10].

Таким образом, на фоне глобальной эпидемии М/ШЛУ ТБ необходима как оптимизация диагностики ЛУ ТБ и раннее назначение курса контролируемой химиотерапии, подобранного исходя из лекарственной чувствительности (ЛЧ) возбудителя, так и включение в курс химиотерапии новых ПТП, эффективных в отношении М/ШЛУ ТБ [6, 8, 11].

### **Технологии диагностики лекарственной чувствительности МБТ в РФ**

Разработка и внедрение перспективных технологий для ускоренной диагностики ТБ и определения ЛЧ возбудителя крайне важны для обеспечения высокоэффективного лечения, основанного на подборе персонализированных режимов химиотерапии. Одним из наиболее перспективных и востребованных направлений в развитии лабораторной диагностики ТБ, которое поддерживается ВОЗ, Глобальной лабораторной инициативой и Европейской лабораторной инициативой, является использование молекулярно-генетических методов (МГМ) [12].

Применение для диагностики туберкулеза метода ПЦР позволяет в течение 1 рабочего дня (2–3 ч) установить наличие ДНК МБТ в диагностическом материале. Предпочтение отдается тест-системам с детекцией результата в режиме реального времени, которые практически полностью исключают риск контаминации образцов продуктами амплификации [13].

Определение ЛЧ с помощью МГМ основано на выявлении точечных мутаций в генах МБТ, ответственных за формирование лекарственной резистентности к ПТП. На основании принципа детекции мутаций тест-системы для определения ЛУ МБТ можно разделить на две группы:

- гибридационные технологии, основанные на связывании продуктов ПЦР со специфическими олигонуклеотидами, иммобилированными на матрице, которая может представлять собой биологический микрочип или ДНК-стрип;
- технологии с использованием мультиплексной ПЦР, позволяющей использовать одновременно более одной пары праймеров для выявления нескольких альтераций.

Обе группы методов обладают сходной специфичностью при определении ЛУ к заявленным ПТП, но тест-системы, основанные на мультиплексной ПЦР, менее трудоемки по сравнению с гибридационными технологиями и характеризуются более высокой чувствительностью и низкой вероятностью контаминации.

Примером тест-системы на основе гибридационной технологии является «ТБ-биочип-1» (специфичность по рифампицину 95%, по изониазиду 80%) – разработка Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта (ООО «БИОЧИП-ИМБ») [14, 15].

Второй тест-системой на основе гибридационной технологии, используемой в РФ для определения ЛЧ к препаратам первого ряда, является набор производства Hain Lifescience (Германия): Geno Type MTBDRplus (специфичность по рифампицину – 98%, изониазиду – 92%) [16].

К недостаткам гибридационных технологий можно отнести наличие этапа гибридации, длящегося от 2 до 18 ч, а также высокую степень риска возникновения контаминации, т.к. для нанесения на матрицу используются продукты амплификации [14, 16].

Наиболее перспективным методом определения генотипической ЛУ является мультиплексная ПЦР в режиме реального времени. Преимуществом данного метода перед описанными выше технологиями является отсутствие этапа гибридации и оценка результатов в режиме реального времени, что позволяет снизить возможность контаминации. Примером таких тест-систем может служить GeneXpert MTB/RIF (Ceipheid, США). Однако данная тест-система определяет устойчивость только к рифампицину (специфичность 90% [17]) и характеризуется очень высокой стоимостью анализа.

Из российских ПЦР тест-систем для определения МЛУ можно отметить «Амплитуб-МЛУ-РВ» производства ЗАО «Синтол» (специфичность по рифампицину и изониазиду около 94%) [18, 19].

В настоящее время завершается регистрация новой мультиплексной тест-системы «Полипроб ЛУ ТБ-1» (специфичность по рифампицину 98,9%, по изониазиду – 95,4%) совместной разработки ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС» и ООО «Энджентикс». В отличие от аналогов, у «Полипроб ЛУ ТБ-1» отсутствует этап, на котором с целью повышения чувствительности реакции в течение нескольких циклов происходит амплификация целевых последовательностей, и последующая реакция ПЦР идет с использованием этих продуктов. Это позволяет снизить риск контаминации.

В связи с ростом встречаемости преШЛУ и ШЛУ МТБ в популяции все актуальнее становится возможность определения ЛУ к препаратам терапии второго ряда (фторхинолоны, аминогликозиды, циклические пептиды). Имеющиеся в настоящее время диагностические системы для определения ШЛУ МТБ относятся к гибридационным. Это «ТБ-биочип-2» (фторхинолоны) и «ТБ-тест» (рифампицин, изониазид, этамбутол, аминогликозиды, циклические пептиды) производства ООО «БИОЧИП-ИМБ» и GenoTypeMTBDRsl производства Hain Lifescience (Германия) (специфичность по фторхинолонам, этамбутолу и аминогликозидам/циклическим пептидам более 81%) [20–24].

В настоящий момент на рынке диагностических ПЦР-систем отсутствуют наборы, позволяющие выявить ШЛУ возбудителя в режиме реального времени. Но необходимо отметить, что две тест-системы отечественного производства находятся в процессе получения регистрационных удостоверений. Это «Амплитуб-FQ-РВ» производства ЗАО «Синтол» (только к фторхинолонам) и «Полипроб ЛУ ТБ-2» производства ООО «Энджентикс» (ЛУ/ЛЧ к фторхинолонам, амикацину/канамицину, капреомицину).

Необходимо отметить, что определение МГМ ЛУ возбудителя является первоначальным этапом обследования больного, т.к. позволяет быстро и достоверно выявлять ЛУ к рифампицину, изониазиду и основным препаратам второго

ряда, что дает возможность отделять поток больных М/ШЛУ туберкулезом на этапе поступления в стационар. Для более полной диагностики необходимо применение культуральных методов, т.к. молекулярно-генетические тест-системы определения ЛУ в настоящее время разработаны не для всех ПТП, и диагностическая чувствительность их в некоторых случаях недостаточна для назначения корректного режима лечения.

### Новые препараты для лечения М/ШЛУ ТБ

Предложенные еще в середине прошлого века ПТП первого ряда практически исчерпали свои возможности в условиях нарастающей эпидемии М/ШЛУ ТБ. Отсутствие эффективных схем химиотерапии приводит к тому, что более чем в 50% случаев терапия этих форм ТБ оказывается неэффективной. Вследствие этого возрастает необходимость разработки новых режимов химиотерапии с ПТП, действующими на новые мишени в микобактериальной клетке, что позволит избежать возникновения перекрестной резистентности.

В 2014 г. ВОЗ был издан «Сопутствующий справочник руководства по программному ведению ТБ с ЛУ», где, помимо традиционных ПТП, при лечении М/ШЛУ ТБ рекомендуется применять ряд новых соединений, которые можно разделить на 3 группы: модификации существующих ПТП (рифабутин, рифапентин, гатифлоксацин, моксифлоксацин), известные классы антибактериальных соединений и их модификации, активные в отношении МБТ (клоfazимин, линезолид, деламанид) и ПТП с принципиально новым механизмом действия (бедаквилин) [25].

### Модификации существующих ПТП

К модификациям существующих ПТП относятся производные рифампицина – рифабутин и рифапентин, которые обладают более высокой активностью в отношении МБТ в сравнении с рифампицином, имеют более длительный период полувыведения и лучше проникают в ткани [26, 27]. Новое производное рифампицина – рифалазил (Rifalazil) в экспериментах *in vitro* показал наибольшую из класса активность в отношении МБТ, которая в 100 раз превышает активность рифампицина, а также большую эффективность при проведении 2-й фазы клинических испытаний [28].

Для лечения МЛУ ТБ используются препараты из группы фторхинолонов [29, 30]. Для последних генераций применяемых в клинической практике фторхинолонов (гатифлоксацин и моксифлоксацин) была показана более высокая активность в отношении МБТ и улучшенная фармакокинетика по сравнению с предшественниками (офлоксацином и левофлоксацином) [31].

### Известные классы антимикобактериальных соединений и их модификации, активные в отношении МБТ

В безальтернативных случаях при лечении ШЛУ ТБ в составе комбинированной терапии применяют противолепрозное средство клоfazимин [32, 33]. Препарат обладает высокой стерилизующей активностью и демонстрирует синергический эффект при действии в комбинации с ПТП в модели мышинного ТБ, а также характеризуется низкой частотой развития устойчивости [32]. Однако, несмотря на его эффек-

тивность против МБТ, клофазимин имеет низкую растворимость, помимо этого, для препарата характерен крайне длительный период полувыведения, что ведет к чрезмерной кумуляции в тканях и последующим побочным эффектам, включая выраженное обесцвечивание кожи. В настоящее время на этапе доклинических исследований находится производное клофазимина – ТВ1-166 с улучшенными физико-химическими и фармакокинетическими свойствами [34].

Антибиотик линезолид (класс оксазолидиноны) рекомендован к использованию при ШЛУ ТБ и МЛУ ТБ с устойчивостью к фторхинолонам. Его включение в схему терапии приводит к повышению частоты успешных исходов лечения. Так, при добавлении линезолида к схеме лечения ШЛУ ТБ, оказавшейся неэффективной, через 6 мес после начала приема линезолида у 87% пациентов происходило абациллирование мокроты по данным культуральных методов исследования [35, 36]. Особенности фармакокинетики линезолида, такие как высокая биодоступность при оральном введении и хорошее распределение в жидкости эпителиальной выстилки легких, дают основание предположить, что этот класс препаратов способен проникать в труднодоступные толстостенные полости легких и поражения, где обычно располагаются МБТ [37].

Модификация оксазолидинонов привела к появлению новых структур (PNU-100480 – сутезолид и AZD-5847) с повышенной активностью в отношении МБТ [36, 38, 39]. Эти кандидаты проходят в настоящее время II фазу клинических испытаний, в ходе которых, помимо противотуберкулезной активности, изучают преодоление проблем токсичности линезолида, тромбоцитопению, миелосупрессию и нейропатии, наблюдающиеся у пациентов при длительном лечении [40].

Среди перспективных разработок новых ПТП следует также отметить соединение SQ-109 (аналог этамбутола), находящееся на стадии II фазы клинических исследований у пациентов с МЛУ ТБ. По данным экспериментов, препарат обладает высокой эффективностью в отношении ЛЧ и ЛУ ТБ, а также в отношении медленно вегетирующих форм и имеет очень низкие показатели возникновения спонтанной ЛУ, обладает хорошей безопасностью и переносимостью, имеет синергетический эффект при одновременном применении с другими ПТП [41, 42]. Соединение не обладает перекрестной резистентностью с этамбутолом вследствие многокомпонентного механизма действия.

К новым производным класса нитроимидазолов, традиционно используемых для лечения инфекций, вызванных анаэробными бактериями, и паразитарных инфекций, относится деламанид (OPC-67683). В комбинации с другими ПТП препарат показал хорошую переносимость и высокую эффективность [43]. Еще одно производное нитроимидазолов – претоманид (PA-824) проходит клинические испытания в составе новых режимов химиотерапии, призванных сократить сроки лечения МЛУ ТБ до 4 (претоманид – моксифлоксацин – пипразинамид, III фаза клинических испытаний [44, 45]) или до 3 мес (бедаквилин – претоманид – пипразинамид, II фаза клинических испытаний [46]). Ожидаемое сокращение продолжительности курса терапии связано с уникальным механизмом действия нитроимидазолов, имитирующим стратегию защиты хозяина за счет производства микробцидных молекул, таких как оксид азота и другие промежуточные продукты ре-

активного азота, которые повреждают множество целей, в том числе цитохромоксидазу дыхательной цепи [47]. Специфичность воздействия достигается тем, что нитроимидазолы, будучи пролекарствами, биоактивируются флавинозависимыми нитроредуктазами, которые отсутствуют в клетках млекопитающих, но присутствуют в МБТ [48]. Такой механизм действия обеспечивает действие производных нитроимидазолов на dormantные МБТ, нитроредуктазы которых остаются активными, несмотря на общее снижение процессов транскрипции [47]. Препарат следующего поколения нитроимидазолов с противотуберкулезной активностью – ТВА-354 проходит I фазу клинических испытаний [49].

### Новые классы ПТП

В 2012 г. в РФ начато производство нового ПТП перхлорон (тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат), синтезированного в Иркутском институте химии СО РАН (АО «Фармасинтез»). Механизм действия и пути метаболизма активного вещества окончательно не установлены, изучение продолжается. Химическая структура препарата изучена в отделении микробиологии Университета Сингапур под руководством Т. Dick. Препарат показал кросс-резистентность с тиацетазоном [50]. Доклинические исследования и клинические испытания показали, что применение перхлорона повышает эффективность комплексной терапии МЛУ ТБ [51–53]. В настоящее время ведется доработка препарата, направленная на снижение его гепато- и нефротоксичности [54].

В 2013 г. на российском рынке появился новый противотуберкулезный препарат бедаквилин (ТМС 207), относящийся к классу диарилхинолинов, который с 2014 г. включен в Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению М/ШЛУ ТБ [4]. Бактерицидное действие препарата обусловлено ингибированием протонной помпы АТФ-синтазы микобактерий – фермента, играющего основную роль в процессе клеточного дыхания МБТ. Основными недостатками бедаквилина, выявленными в клинических испытаниях, являются его гепатотоксичность и нежелательные лекарственные взаимодействия [55, 56]. Кроме того, уже описаны случаи ЛУ МБТ к бедаквилину [57].

### Разрабатываемые ПТП

Несмотря на появление на рынке новых противотуберкулезных препаратов, вопросы безопасности и эффективности лечения остаются открытыми. В связи с этим разработка новых лекарственных средств остается весьма актуальной проблемой.

На стадии доклинических испытаний находятся кандидатные препараты класса нуклеозидных антибиотиков с противотуберкулезным эффектом, обладающие мощным бактерицидным действием как в отношении активно делящихся МБТ, так и dormantных форм возбудителя (CPZEN-45 и SQ-641) [58, 59].

Первым представителем нового класса производных амидаимидазопиридина, вышедшим в I фазу клинических испытаний, является кандидатный препарат Q203. Механизм действия препарата реализуется на уровне цитохромного комплекса bc<sub>1</sub> (комплекс III) дыхательной цепи МБТ. В доклинических исследованиях показана активность Q203 в отношении как ЛЧ, так и ЛУ клинических изолятов МБТ.

Эффективность в модели ТБ на животных продемонстрирована в микромолярных концентрациях. Отмечена низкая частота развития ЛУ, активность в модели латентного туберкулеза и благоприятный фармакокинетический профиль, что важно при проведении долговременного лечения [60].

Особого внимания заслуживает новый препарат PBTZ169, который, по оценкам международных экспертов, может стать одним из самых эффективных средств лечения ТБ различной степени тяжести за последние 10 лет [61, 62].

Препарат является представителем нового класса противотуберкулезных соединений (Benzothiazinone), который был разработан Политехническим университетом Лозанны (École Polytechnique Fédérale de Lausanne – EPFL). Мишенью соединения является декаprenилфосфорил-b-D-рибозо-2-эпимераза (DprE1), необходимый фермент в синтезе арабиногалактана, что обеспечивает высокую активность PBTZ169 в отношении как ЛЧ, так и М/ШЛУ ТБ [63, 64]. Уникальный механизм действия PBTZ169 доказан на молекулярном уровне [65]. Для мониторинга возникновения возможной резистентности к бензотиазинонам было протестировано 240 чувствительных и МЛУ клинических изолятов *M. tuberculosis* из 4 госпиталей Европы на предмет мутации гена *dprE1*. Во всех штаммах была подтверждена высокая чувствительность к бензотиазинонам [66].

На сегодняшний день соединение PBTZ169 – самое активное вещество, действующее на клетки микобактерий (МИК <0,2 нг/мл по REMA) [61]. В исследованиях показано отсутствие цитотоксичности PBTZ169, а также отсутствие антагонизма при применении в сочетании с изониазидом, рифампицином, моксифлоксацином, PA-824 и SQ109, а в комбинации с беквакином и пиперазином отмечен синергический эффект [67]. В модели хронической туберкулезной инфекции у мышей было показано, что эффективность комбинации PBTZ169, беквакин и пиперазид превосходит стандартную комбинацию изониазид, рифампидин и пиперазид, приводя к более быстрому снижению бактериальной нагрузки в легких и селезенке [61]. На базе ЦНИИТ проведены доклинические исследования PBTZ169, в которых продемонстрирована крайне высокая специфическая активность *in vitro* в отношении МЛУ и ШЛУ штаммов, в том числе от ВИЧ-инфицированных пациентов [68]. Минимальная бактерицидная концентрация *in vitro* в системе ВАСТЕС MGIT960 составляла 0,037 мкг/мл для десяти ШЛУ штаммов от ВИЧ-отрицательных пациентов и 0,037–0,111 мкг/мл для штаммов от ВИЧ-положительных пациен-

тов [68]. Кроме того, была подтверждена эффективность препарата *in vivo* на моделях хронического и острого ТБ.

В настоящее время в России успешно завершены клинические исследования I фазы PBTZ169 и проходит 2A фаза на пациентах с туберкулезом легких, в середине 2017 г. планируется начать клинические исследования I фазы в Европе. В РФ доклинические и клинические исследования, а также коммерческое производство PBTZ169 осуществляет ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС» на базе лицензионного соглашения с EPFL. В работе участвует международный консорциум научных групп и ученых при поддержке государственных структур и структур здравоохранения.

### Заключение

Неуклонный рост числа случаев ТБ с М/ШЛУ представляется угрозой для общественного здравоохранения и имеет характер глобальной эпидемии, которую признает как ВОЗ, так и международная общественность и отечественная фтизиатрия [1, 69, 70]. Низкий уровень эффективности лечения больных ТБ обусловлен отсутствием своевременной диагностики и контроля химиотерапии, а также эффективных современных препаратов. Эксперты ВОЗ, считая МЛУ ТБ кризисом общественного здравоохранения, в качестве приоритетных направлений по борьбе с эпидемией называют, в частности, расширение использования методов экспрестестирования и выявления случаев МЛУ ТБ, а также проведение научных исследований для разработки новых средств диагностики, лекарственных препаратов и схем лечения [1].

Разработанные в 2014 г. Российским обществом фтизиатров «Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза» предлагают алгоритм диагностики ТБ с использованием самых современных молекулярно-генетических технологий [13]. Назначение терапии по данным МГМ на этапе интенсивной фазы терапии повышает эффективность лечения ТБ с ЛУ и предотвращает его распространение [6, 8, 11]. Однако если тест-системы для определения МЛУ ТБ представлены в РФ достаточно полно, то для выявления ШЛУ ТБ доступна только немецкая тест-система Geno Type MTBDRsl (Hain Lifescience), обладающая всеми недостатками тест-систем, основанных на гибридизации. В настоящее время в ЦНИИТ завершены технические испытания тест-системы «Полипроб ШЛУ-ТБ» (совместная разработка ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС» и ООО «Энджентикс») для опреде-



## НИАРМЕДИК

### ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ НАБОРЫ И ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Исследования и разработка
- Производство
- Продажи
- Оборудование для медицинских лабораторий

### ФАРМАЦЕВТИКА

- Исследования и разработка
- Производство
- Продвижение
- Продажи

НИАРМЕДИК — российская фармацевтическая, биотехнологическая и медицинская компания, основанная в 1989 году группой ученых из НИИ эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи.

Компания НИАРМЕДИК создает и развивает диагностический, фармацевтический и медицинский бизнес на основании собственных исследований и переноса передовых зарубежных технологий.

[www.nearmedic.ru](http://www.nearmedic.ru)

ления МБТ с ШЛУ, отечественной тест-системы, которая позволит в режиме ПЦР в реальном времени определять устойчивость к фторхинолонам и аминогликозидам/циклическим пептидам.

Успех в лечении М/ШЛУ ТБ невозможен без применения новых ПТП. В связи с этим важно отметить, что в РФ серьезно занимаются проблемой ТБ и внедрением новейших препаратов, таких как линезолид, бедаквилин и последние генерации фторхинолонов, для лечения МЛУ и ШЛУ форм ТБ [8]. В результате эффективного международного научно-производственного сотрудничества EPFL, ЦНИИТ и «НИАРМЕДИК ПЛЮС» происходит параллельный вывод на рынок РФ и стран Евросоюза препарата RBTZ169 – новейшего соединения с доказанной противотуберкулезной активностью (по результатам исследований *in vitro* наиболее активное соединение на сегодня), уникальным механизмом действия и благоприятным профилем безопасности.

Таким образом, благодаря работе интернационального научного коллектива с участием ЦНИИТ, EPFL и ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», в РФ создается комплексная платформа по борьбе с устойчивыми формами ТБ на базе усовершенствованной мультиплексной тест-системы и уникального ПТП, внедрение которой позволит повысить эффективность ведения М/ШЛУ ТБ, а в перспективе способно кардинально изменить эпидемиологическую ситуацию по ТБ в глобальном масштабе.

## Литература

- Global tuberculosis report 2014. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2014, 171 p.
- Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России. Противотуберкулезные мероприятия. Федеральный Центр мониторинга противодействия распространению туберкулеза. Доступно по: <http://www.mednet.ru/images/stories/files/CMT/tb2015.pdf>
- Туберкулез в Российской Федерации 2011 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. М., 2013, 280 с.
- Васильева ИА, Аксенова ВА, Эргешов АЭ, Марьяндышев АО, Самойлова АГ, Багдасарян ТР, и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. М., Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2014, 72 с.
- Нечаева ОБ. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в Российской Федерации (основные тенденции). X съезд Российского общества фтизиатров «Актуальные вопросы противотуберкулезной помощи в Российской Федерации». Презентация. Воронеж. 2015. Доступно по: [http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/epid\\_situaciya\\_sezd\\_ftiziatrov.pdf](http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/epid_situaciya_sezd_ftiziatrov.pdf)
- Черноусова ЛН, Васильева ИА, Заседателев АС, Соболев АЮ, Михайлович ВМ. Клиническое значение микрочиповой технологии определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза. Проблемы туберкулеза. 2002;6:21-4.
- Стерликов СА, Тестов ВВ. Результаты лечения пациентов с туберкулезом. X съезд Российского общества фтизиатров «Актуальные вопросы противотуберкулезной помощи в Российской Федерации». Презентация. Воронеж. 2015. Доступно по: [http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/rez\\_lecheniya.pdf](http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/rez_lecheniya.pdf)
- Самойлова АГ, Багдасарян ТР, Ларионова ЕЕ, Сороковиков ИВ, Черноусова ЛН, Васильева ИА. Эффективность комплексного лечения больных МЛУ/ШЛУ туберкулезом. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Туберкулез с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя: ситуация, проблемы и пути решения». Москва. 2014. Презентация. Доступно по: [http://roftb.ru/netcat\\_files/doks/7Samoilova.pdf](http://roftb.ru/netcat_files/doks/7Samoilova.pdf)
- Ягудина РИ, Сороковиков ИВ. Фармакоэкономика туберкулеза: методологические особенности проведения исследований. Фармакоэкономика. Теория и практика. 2014;2(4):10-3.
- Пекинский «Призыв к действиям» по борьбе с туберкулезом и оказанию медицинской помощи пациентам: все вместе на борьбу с глобальной эпидемией МЛУ/ШЛУ-ТБ. Доступно по: [http://www.who.int/tb\\_beijingmeeting/media\\_call\\_for\\_action\\_ru.pdf?ua=1](http://www.who.int/tb_beijingmeeting/media_call_for_action_ru.pdf?ua=1)
- Vasilieva I, Samoiloa A, Burakova M, Smirnova T, Andreevskaya S, Larionova E. The role of Xpert MTB/Rif test in the effectiveness of treatment of MDR-TB patient. Int J Tub Lung Dis. 2013;17(12):472.
- The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2010, 101 p.
- Черноусова ЛН, Севастьянова ЭВ, Ларионова ЕЕ, Смирнова ТГ, Андреевская СН, Попов СА, и др. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2015, 46 с.
- Руководство по применению набора реагентов для выявления микобактерий туберкулезного комплекса и определения их лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду на биологических микрочипах «ТБ-БИОЧИП-1». Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ № ФСР 2011/10088 от 03.02.2011 г.
- ООО «БИОЧИП-ИМБ». Информация с сайта производителя. Доступно по: <http://www.biochip-imb.ru/index.php/test-systems/tuberculosis-biochips/24-tb-biochip-1>
- Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB). Expert group report. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2008, 47 p.
- Быстрое внедрение диагностического теста Xpert MTB/RIF. Технические и операционные рекомендации; Вопросы практического применения. ВОЗ. Женева, 2011, 41 с.
- Молекулярно-генетическая диагностика туберкулеза методом ПЦР в реальном времени. Технология «АМПЛИТУБ». Доступно по: <http://syntol.ru/upload/iblock/668/668cfb7845b8f32a223124ad74a3a780.pdf>
- Владимирский МА, Шутьгина МВ, Варламов ДА, Аляпкина ЮС, Шипина ЛК, Домотенко ЛВ, и др. Применение метода ПЦР в реальном времени для определения и контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза. Проблемы туберкулеза. 2008;4:38-44.
- Антонова ОВ, Гряднов ДА, Лапа СА, Кузьмин АВ, Ларионова ЕЕ, Смирнова ТГ, и др. Выявление мутаций в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, приводящих к устойчивости к фторхинолонам, методом гибридизации на биологических микрочипах. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008;145(1):115-20.
- Руководство по применению набора реагентов для выявления микобактерий туберкулезного комплекса и определения их лекарственной чувствительности к фторхинолонам на биологических микрочипах «ТБ-БИОЧИП-2». Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ № ФСР 2010/08555 от 03.10.2010 г.
- Информация с сайта производителя. Доступно по: <http://biochip-imb.ru/index.php/8-test-systems/tuberculosis/40-tb-test>
- The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Expert group meeting report. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2013, 52 p.

24. Tagliani E, Cabibbe AM, Miotto P, Borroni E, Toro JC, Mansjö M, et al. Diagnostic Performance of the New Version (v2.0) of GenoTypeMTBDRsl Assay for Detection of Resistance to Fluoroquinolones and Second-Line Injectable Drugs: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol.* 2015;53(9):2961-9.
25. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2014, 462 p.
26. Brogden RN, Fitton A. Rifabutin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs.* 1994;47:983-1009.
27. Dorman SE, Goldberg S, Stout JE, Muzanyi G, Johnson JL, Weiner M, et al. Vernon A., Schluger N.W. Substitution of rifapentine for rifampin during intensive phase treatment of pulmonary tuberculosis: study 29 of the tuberculosis trials consortium. *J Infect Dis.* 2012;206(7):1030-40.
28. Dietze R, Teixeira L, Rocha LM, Palaci M, Johnson JL, Wells C, et al. Safety and bactericidal activity of Rifalazil in patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):1972-6.
29. Hooper DC, Wolfson JS. The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses and toxicities in humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28:716-21.
30. Alangaden GJ, Lerner SA. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. *Clin Infect Dis.* 1997;25:1213-21.
31. Pranger A, Alffenaar J, Aarnoutse R. Fluoroquinolones, the cornerstone of treatment of drug-resistant tuberculosis: a pharmacokinetic and pharmacodynamic approach. *Curr Pharm Des.* 2011;17(27):2900-30.
32. Jagannath C, Reddy MV, Kailasam S, O'Sullivan JF, Gangadharam PR. Chemotherapeutic activity of clofazimine and its analogues against *Mycobacterium tuberculosis*. In vitro, intracellular, and in vivo studies. *Am J Resp Crit Care Med.* 1995;151:1083-6.
33. Dey T, Brigden G, Cox H, Shubber Z, Cooke G, Ford N. Outcomes of clofazimine for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(2):284-93.
34. Zhang D, Liu Y, Zhang C, Zhang H, Wang B, Xu J, et al. Synthesis and biological evaluation of novel 2-methoxy-pyridylamino-substituted riminophenazine derivatives as antituberculosis agents. *Molecules.* 2014;19(4):4380-94.
35. Chang K.-C., Yew W.-W., Tam C.-M., Leung C.-C. WHO group 5 drugs and difficult multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review with cohort analysis and meta-analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4097-104.
36. Williams KN, Stover CK, Tasneen TZR, Tyagi S, Grosset JH, Nuermberger E. Promising antituberculosis activity of the oxazolidinone PNU-100480 relative to linezolid in the murine model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:371-6.
37. Conte JE. Jr., Golden JA, Kipps J, Zurlinden E. Intrapulmonary pharmacokinetics of linezolid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1475-80.
38. Wallis RS, Dawson R, Friedrich SO, Venter A, Paige D, Zhu T, et al. Mycobactericidal activity of sutezolid (PNU-100480) in sputum (EBA) and blood (WBA) of patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 2014;9(4):e94462.
39. Balasubramanian V, Solapure S, Iyer H, Ghosh A, Sharma S, Kaur P, et al. Bactericidal activity and mechanism of action of AZD5847, a novel oxazolidinone for treatment of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):495-502.
40. Fortún J, Martín-Dávila P, Navas E, Pérez-Eliás MJ, Cobo J, Tato M, et al. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):180-5.
41. Li K, Schurig-Briccio LA, Feng X, Upadhyay A, Pujari V, Lechartier B, et al. Multitarget drug discovery for tuberculosis and other infectious diseases. *J Med Chem.* 2014;57(7):3126-39.
42. SQ109. Available at: <http://www.infected.ru/content/sq109>
43. The use of delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Interim policy guidance. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2014, 80 p.
44. Tasneen R, Li SY, Peloquin CA, Taylor D, Williams KN, Andries K, et al. Sterilizing activity of novel TMC207- and PA-824-containing regimens in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(12):5485-92.
45. ACT Toolkit 2.0 Advocacy for Community Treatment Strengthening Community Responses to HIV Treatment and Prevention. Available at: <http://www.newtdrugs.org/project.php?id=180120>
46. ACT Toolkit 2.0 Advocacy for Community Treatment Strengthening Community Responses to HIV Treatment and Prevention. Available at: <http://www.newtdrugs.org/project.php?id=180121>
47. Singh R, Manjunatha U, Boshoff HI, Ha YH, Niyomrattanakit P, Ledwidge R, et al. PA-824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science.* 2008;322:1392-5.
48. Manjunatha U, Boshoff HI, Barry CE. The mechanism of action of PA-824: novel insights from transcriptional profiling. *Commun Integr Biol.* 2009;2:215-8.
49. Working Group on New TB Drugs. Available at: <http://www.newtdrugs.org/project.php?id=48>
50. Gopal P, Dick T. The new tuberculosis drug Perchlozone® shows cross-resistance with thiacetazone. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(4):430-3.
51. Виноградова ТИ, Александрова АЕ, Антоненкова ЕВ, Елохина ВН, Нахманович АС. Конструирование и исследование новых веществ, обладающих противотуберкулезной активностью: оригинальное соединение перхлозон как возможное средство этиотропной терапии туберкулеза. *Проблемы туберкулеза.* 1999;3:45-7.
52. Старшинова АА, Павлова МВ, Яблонский ПК, Сапожникова НВ, Виноградова ТИ, Чернохаева ИВ, и др. Эволюция фтизиатрии – это поиск новых методов и препаратов, эффективных при лечении туберкулеза. *Практическая медицина.* 2014;7(83):127-32.
53. Яблонский ПК, Виноградова ТИ, Павлова МВ, Сапожникова НВ, Васильева СН, Арчакова ЛИ и др. Методические рекомендации по применению противотуберкулезного препарата Перхлозон в комплексном лечении туберкулеза органов дыхания. *Медицинский альянс.* 2013;2:69-81.
54. Малханова ГН. Профилактика гепато- и нефротоксичности нового противотуберкулезного средства "Перхлозон". *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО ПAMH.* 2007;5:128-9.
55. Matteelli A, Carvalho AC, Dooley KE, Kritski A. TMC207: the first compound of a new class of potent anti-tuberculosis drugs. *Future Microbiol.* 2010;5(6):849-58.
56. The use of bedaquiline in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis Interim policy guidance. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2013, 64 p.
57. Andries K, Vilellas C, Coeck N, Thys K, Gevers T, Vranckx L, et al. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PLoS One.* 2014;9(7):e102135.
58. Salomon JJ, Galeron P, Schulte N, Morow PR, Severynse-Stevens D, Huwer H, et al. Biopharmaceutical in vitro characterization of CPZEN-45, a drug candidate for inhalation therapy of tuberculosis. *Ther Deliv.* 2013;4(8):915-923.
59. Nikonenko B, Reddy VM, Bogatcheva E, Protopopova M, Einck L, Nacy CA. Therapeutic efficacy of SQ641-NE against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):587-9.
60. Pethe K, Bifani P, Jang J, Kang S, Park S, Ahn S, et al. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. *Nat Med.* 2013;19(9):1157-60.
61. Makarov V, Lechartier B, Zhang M, Neres J, van der Sar AM, Raadsen SA, et al. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Mol Med.* 2014;6(3):372-83.
62. Cookson C. Genetics offers route to cure TB. *Financial times.* 2014. Available at: <http://www.ft.com/cms/s/0/33f10958-a52b-11e3-8988-00144feab7de.html#axzz3pWV4KRb6>.
63. Makarov V, Manina G, Mikusova K, Möllmann U, Ryabova O, Saint-Joanis B, et al. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. *Science.* 2009;324(5928):801-4.
64. Trefzer C, Škovierová H, Buroni S, Bobovská A, Nenci S, Molteni E, et al. Benzothiazinones are suicide inhibitors of mycobacterial decaprenylphosphoryl-β-D-ribofuranose 2'-oxidase DprE1. *J Am Chem Soc.* 2012;134(2):912-5.

65. Neres J, Pojer F, Molteni E, Chiarelli LR, Dhar N, Boy-Röttger S, et al. Structural basis for benzothiazinone-mediated killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med*. 2012;4(150):150ra121.
66. Pasca MR, Degiacomi G, Ribeiro AL, Zara F, De Mori P, Heym B, et al. Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in four European hospitals are uniformly susceptible to benzothiazinones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(4):1616-8.
67. Lechartier B, Hartkoorn RC, Cole ST. In vitro combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5790-3.
68. Черноусова ЛН, Андреевская СН, Смирнова ТГ, Ларионова ЕЕ, Андриевская ИЮ, Шевкун НА. Активность in vitro лекарственного кандидата PBTZ169, гидрохлорид, в отношении клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью. *Туберкулез и болезни легких*. 2016;94(9):73-9.
69. Cochrane L. Drug-resistant-tuberculosis outbreak would be equal to Ebola threat: Costello. *ABC News*. 2015. Available at: <http://www.abc.net.au/pm/content/2015/s4181008.htm>.
70. Васильева ИА. Стратегия развития фтизиатрической службы в РФ. X съезд Российского общества фтизиатров «Актуальные вопросы противотуберкулезной помощи в Российской Федерации». Воронеж. 2015. Презентация. Доступно по: [http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/epid\\_situaciya\\_sezd\\_ftiziatrov.pdf](http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/epid_situaciya_sezd_ftiziatrov.pdf).

## References

1. Global tuberculosis report 2014. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2014, 171 p.
2. The epidemiological situation of tuberculosis in Russia. Anti-tuberculosis measures. Federal monitoring Center of counteraction to TB. Available at: <http://www.mednet.ru/images/stories/files/CMT/tb2015.pdf> (In Russian).
3. Tuberculosis in the Russian Federation, 2011 Analytical review of statistical indicators used in the Russian Federation and in the world. Moscow, 2013, 280 p. (In Russian).
4. Vasil'eva IA, Aksenova VA, Ergeshov AE, Mar'yandyshev AO, SamoiloVA AG, Bagdasaryan TR, et al. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu tuberkuleza organov dykhaniya s mnozhestvennoi i shirokoi lekarstvennoi ustoichivost'yu vozбудitelya [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of respiratory organs with multiple and extensive drug resistant pathogen]. Moscow, Tver': "Triada" Publ., 2014, 72 p. (In Russian).
5. Nechaeva OB. Epidemicheskaya situatsiya po tuberkulezu v Rossiiskoi Federatsii (osnovnye tendentsii) [The epidemiological situation of tuberculosis in the Russian Federation (the main trends)]. X Congress of Russian society of phthisiatricians "Actual issues of TB care in the Russian Federation". Presentation. Voronezh. 2015. Available at: [http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/epid\\_situaciya\\_sezd\\_ftiziatrov.pdf](http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/epid_situaciya_sezd_ftiziatrov.pdf) (In Russian).
6. Chernousova LN, Vasil'eva IA, Zasedatelev AS, Sobolev AY, Mikhailovich VM. Klinicheskoe znachenie mikrochipovoi tekhnologii opredeleniya lekarstvennoi ustoichivosti mikobakterii tuberkuleza. *Problemy tuberkuleza*. 2002;6:21-4. (In Russian).
7. Sterlikov SA, Testov VV. Rezul'taty lecheniya patsientov s tuberkulezom [The results of treatment of patients with tuberculosis]. X Congress of Russian society of phthisiatricians "Actual issues of TB care in the Russian Federation". Presentation. Voronezh. 2015. Available at: [http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/rez\\_lecheniya.pdf](http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/rez_lecheniya.pdf) (In Russian).
8. SamoiloVA AG, Bagdasaryan TR, Larionova EE, Sorokovikov IV, Chernousova LN, Vasil'eva IA. Effektivnost' kompleksnogo lecheniya bol'nykh MLU/ShLU tuberkulezom [The efficiency of complex treatment of patients with MDR/XDR tuberculosis]. All-Russian scientific-practical conference with international participation "Tuberculosis with multiple and extensive drug resistant pathogen: situation, problems and solutions". Moscow. 2014. Presentation. Available at: [http://roftb.ru/netcat\\_files/doks/7SamoiloVA.pdf](http://roftb.ru/netcat_files/doks/7SamoiloVA.pdf) (In Russian).
9. Yagudina RI, Sorokovikov IV. Farmakoeconomika tuberkuleza: metodologicheskie osobennosti provedeniya issledovaniy. *Pharmacoeconomics: theory and practice*. 2014;2(4):10-3.
10. Pekinskii «Prizyv k deistviyam» po bor'be s tuberkulezom i okazaniyu meditsinskoj pomoshchi patsientam: vse vmeste na bor'bu s global'noi epidemiei MLU/ShLU-TB. Available at: [http://www.who.int/tb\\_beijingmeeting/media/call\\_for\\_action\\_ru.pdf?ua=1](http://www.who.int/tb_beijingmeeting/media/call_for_action_ru.pdf?ua=1) (In Russian).
11. Vasilieva I, SamoiloVA A, Burakova M, Smirnova T, Andreevskaya S, Larionova E. The role of Xpert MTB/Rif test in the effectiveness of treatment of MDR-TB patient. *Int J Tub Lung Dis*. 2013;17(12):472.
12. The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2010, 101 p.
13. Chernousova LN, Sevast'yanova EV, Larionova EE, Smirnova TG, Andreevskaya SN, Popov SA, et al. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po organizatsii i provedeniyu mikrobiologicheskoi i molekulyarno-geneticheskoi diagnostiki tuberkuleza [Federal clinical guidelines on the organization and holding of microbiological and molecular-genetic diagnostics of tuberculosis]. Moscow, Tver': "Triada" Publ., 2015, 46 p. (In Russian).
14. Guidance on the application of a set of reagents for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and determination of their drug susceptibility to rifampicin and isoniazid on biological microchip "TB-BIOCHIP-1". Registration certificate of Federal service for supervision in the sphere of healthcare and social development of the Russian Federation № FSR 2011/10088 from 03.02.2011 (In Russian).
15. OOO «BIOCHIP-IMB». Available at: <http://www.biochip-imb.ru/index.php/test-systems/tuberculosis-biochips/24-tb-biochip-1> (In Russian).
16. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB). Expert group report. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2008, 47 p.
17. Introduction of a diagnostic test Xpert MTB/RIF. Technical and operational recommendations; the Issues of practical application. Who. Geneva, 2011, 41 p. (In Russian).
18. Molecular genetic diagnosis of tuberculosis by PCR method in real time. Technology "AMPLITUBE". Available at: <http://syntol.ru/upload/iblock/668/668cfb7845b8f32a223124ad74a3a780.pdf> (In Russian).
19. Vladimirkii MA, Shul'gina MV, Varlamov DA, Alyapkina YuS, Shipina LK, Domotenko LV, et al. Primenenie metoda PTsR v real'nom vremeni dlya opredeleniya i kontrolya za rasprostraneniye lekarstvenno-ustoichivykh shtammov mikobakterii tuberkuleza. *Problemy tuberkuleza*. 2008;4:38-44. (In Russian).
20. Antonova OV, Gryadunov DA, Lapa SA, Kuz'min AV, Zasedatelev AS, Mikhailovich VM, et al. Detection of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genome determining resistance to fluoroquinolones by hybridization on biological microchips. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2008;145(1):108-13. (In Russian).
21. Guidance on the application of a set of reagents for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and determination of their drug sensitivity to fluoroquinolones on the biological microchip "TB-BIOCHIP-2". Registration certificate of Federal service for supervision in the sphere of healthcare and social development of the Russian Federation № FSR 2010/08555 from 03.10.2010. (In Russian).
22. OOO «BIOCHIP-IMB». Available at: <http://biochip-imb.ru/index.php/8-test-systems/tuberculosis/40-tb-test> (In Russian).
23. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Expert group meeting report. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2013, 52 p.
24. Tagliani E, Cabibbe AM, Miotto P, Borroni E, Toro JC, Mansjö M, et al. Diagnostic Performance of the New Version (v2.0) of GenoTypeMTBDRsl Assay for Detection of Resistance to Fluoroquinolones and Second-Line Injectable Drugs: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol*. 2015;53(9):2961-9.
25. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2014, 462 p.

26. Brogden RN, Fitton A. Rifabutin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*. 1994;47:983-1009.
27. Dorman SE, Goldberg S, Stout JE, Muzanyi G, Johnson JL, Weiner M, et al. Vernon A., Schluger N.W. Substitution of rifapentine for rifampin during intensive phase treatment of pulmonary tuberculosis: study 29 of the tuberculosis trials consortium. *J Infect Dis*. 2012;206(7):1030-6.
28. Dietze R, Teixeira L, Rocha LM, Palaci M, Johnson JL, Wells C, et al. Safety and bactericidal activity of Rifalazil in patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(7):1972-6.
29. Hooper DC, Wolfson JS. The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses and toxicities in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;28:716-21.
30. Alangaden GJ, Lerner SA. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. *Clin Infect Dis*. 1997;25:1213-21.
31. Pranger A, Affenaar J, Aarnoutse R. Fluoroquinolones, the cornerstone of treatment of drug-resistant tuberculosis: a pharmacokinetic and pharmacodynamic approach. *Curr Pharm Des*. 2011;17(27):2900-30.
32. Jagannath C, Reddy MV, Kailasam S, O'Sullivan JF, Gangadharam PR. Chemotherapeutic activity of clofazimine and its analogues against *Mycobacterium tuberculosis*. In vitro, intracellular, and in vivo studies. *Am J Resp Crit Care Med*. 1995;151:1083-6.
33. Dey T, Brigden G, Cox H, Shubber Z, Cooke G, Ford N. Outcomes of clofazimine for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(2):284-93.
34. Zhang D, Liu Y, Zhang C, Zhang H, Wang B, Xu J, et al. Synthesis and biological evaluation of novel 2-methoxy-pyridylamino-substituted riminophenazine derivatives as antituberculosis agents. *Molecules*. 2014;19(4):4380-94.
35. Chang K.-C., Yew W.-W., Tam C.-M., Leung C.-C. WHO group 5 drugs and difficult multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review with cohort analysis and meta-analysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(9):4097-104.
36. Williams KN, Stover CK, Tasneen TZR, Tyagi S, Grosset JH, Nuermberger E. Promising antituberculosis activity of the oxazolidinone PNU-100480 relative to linezolid in the murine model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:371-6.
37. Conte JE. Jr., Golden JA, Kipps J, Zurlinden E. Intrapulmonary pharmacokinetics of linezolid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1475-80.
38. Wallis RS, Dawson R, Friedrich SO, Venter A, Paige D, Zhu T, et al. Mycobactericidal activity of sutezolid (PNU-100480) in sputum (EBA) and blood (WBA) of patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2014;9(4):e94462.
39. Balasubramanian V, Solapure S, Iyer H, Ghosh A, Sharma S, Kaur P, et al. Bactericidal activity and mechanism of action of AZD5847, a novel oxazolidinone for treatment of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):495-502.
40. Fortún J, Martín-Dávila P, Navas E, Pérez-Elías MJ, Cobo J, Tato M, et al. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(1):180-5.
41. Li K, Schurig-Briccio LA, Feng X, Upadhyay A, Pujari V, Lechartier B, et al. Multitarget drug discovery for tuberculosis and other infectious diseases. *J Med Chem*. 2014;57(7):3126-39.
42. SQ109. Available at: <http://www.infected.ru/content/sq109>
43. The use of delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Interim policy guidance. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2014, 80 p.
44. Tasneen R, Li SY, Peloquin CA, Taylor D, Williams KN, Andries K, et al. Sterilizing activity of novel TMC207- and PA-824-containing regimens in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12):5485-92.
45. ACT Toolkit 2.0 Advocacy for Community Treatment Strengthening Community Responses to HIV Treatment and Prevention. Available at: <http://www.newtdrugs.org/project.php?id=180120>
46. ACT Toolkit 2.0 Advocacy for Community Treatment Strengthening Community Responses to HIV Treatment and Prevention. Available at: <http://www.newtdrugs.org/project.php?id=180121>
47. Singh R, Manjunatha U, Boshoff HI, Ha YH, Niyomrattanakit P, Ledwidge R, et al. PA-824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science*. 2008;322:1392-5.
48. Manjunatha U, Boshoff HI, Barry CE. The mechanism of action of PA-824: novel insights from transcriptional profiling. *Commun Integr Biol*. 2009;2:215-8.
49. Working Group on New TB Drugs. Available at: <http://www.newtdrugs.org/project.php?id=48>
50. Gopal P, Dick T. The new tuberculosis drug Perchlozone® shows cross-resistance with thiacetazone. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45(4):430-3.
51. Vinogradova TI, Aleksandrova AE, Antonenkova EV, Elokhnina VN, Nakhmanovich AS. Konstruirovaniye i issledovaniye novykh veshchestv, obladayushchikh protivotuberkuleznoi aktivnost'yu: original'noe soedineniye perkhlozon kak vozmozhnoe sredstvo etiotropnoi terapii tuberkuleza. *Problemy tuberkuleza*. 1999;3:45-7. (In Russian).
52. Starshinova AA, Pavlova MV, Yablonskiy PK, Sapozhnikova NV, Vinogradova TI, Chernokhaeva IV, et al. Evolution of phthisiatry – a search for new methods and drugs effective for the treatment of tuberculosis. *Practical medicine*. 2014;7(83):127-32. (In Russian).
53. Yablonskii PK, Vinogradova TI, Pavlova MV, Sapozhnikova NV, Vasil'eva SN, Archakova LI, et al. Metodicheskie rekomendatsii po primeneniyu protivotuberkuleznogo preparata Perkhlozon v kompleksnom lechenii tuberkuleza organov dykhaniya. *Meditsinskii al'yans*. 2013;2:69-81. (In Russian).
54. Malkhanova GN. Prevention of hepato- and nephro-toxicity of new antituberculous medicine «Per-hlozon». *Bulletin of the East Siberian Scientific Center SBRAMS*. 2007;5:128-9. (In Russian).
55. Matteelli A, Carvalho AC, Dooley KE, Kritski A. TMC207: the first compound of a new class of potent anti-tuberculosis drugs. *Future Microbiol*. 2010;5(6):849-58.
56. The use of bedaquiline in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis Interim policy guidance. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2013, 64 p.
57. Andries K, Vilellas C, Coeck N, Thys K, Gevers T, Vranckx L, et al. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PLoS One*. 2014;9(7):e102135.
58. Salomon JJ, Galeron P, Schulte N, Morow PR, Severynse-Stevens D, Huwer H, et al. Biopharmaceutical in vitro characterization of CPZEN-45, a drug candidate for inhalation therapy of tuberculosis. *Ther Deliv*. 2013;4(8):915-923.
59. Nikonenko B, Reddy VM, Bogatcheva E, Protopopova M, Einck L, Nacy CA. Therapeutic efficacy of SQ641-NE against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):587-9.
60. Pethe K, Bifani P, Jang J, Kang S, Park S, Ahn S, et al. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. *Nat Med*. 2013;19(9):1157-60.
61. Makarov V, Lechartier B, Zhang M, Neres J, van der Sar AM, Raadsen SA, et al. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Mol Med*. 2014;6(3):372-83.
62. Cookson C. Genetics offers route to cure TB. *Financial times*. 2014. Available at: <http://www.ft.com/cms/s/0/33f10958-a52b-11e3-8988-00144feab7de.html#axzz3pWV4KRb6>.
63. Makarov V, Manina G, Mikusova K, Möllmann U, Ryabova O, Saint-Joanis B, et al. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. *Science*. 2009;324(5928):801-4.
64. Trefzer C, Škovierová H, Buroni S, Bobovská A, Nenci S, Molteni E, et al. Benzothiazinones are suicide inhibitors of mycobacterial decaprenylphosphoryl-β-D-ribofuranose 2'-oxidase DprE1. *J Am Chem Soc*. 2012;134(2):912-5.
65. Neres J, Pojer F, Molteni E, Chiarelli LR, Dhar N, Boy-Röttger S, et al. Structural basis for benzothiazinone-mediated killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med*. 2012;4(150):150ra121.
66. Pasca MR, Degiacomi G, Ribeiro AL, Zara F, De Mori P, Heym B, et al. Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in four European hospitals are uniformly susceptible to benzothiazinones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(4):1616-8.
67. Lechartier B, Hartkoorn RC, Cole ST. In vitro combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5790-3.

68. Chernousova LN, Andreevskaya SN, Smirnova TG, Larionova EE, Andrievskaya IYu, Shevkun NA. In vitro action of the drug candidate of PBTZ169, hydrochloride action in respect of clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive drug resistance. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2016;94(9):73-9. (In Russian).
69. Cochrane L. Drug-resistant-tuberculosis outbreak would be equal to Ebola threat: Costello. ABC News. 2015. Available at: <http://www.abc.net.au/pm/content/2015/s4181008.htm>.
70. Vasil'eva IA. Strategiya razvitiya ftiziatricheskoj sluzhby v RF [Strategy for the development of TB services in the Russian Federation]. X Congress of Russian society of phthisiatricians "Actual issues of TB care in the Russian Federation. Presentation. Available at: [http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/epid\\_situaciya\\_sezd\\_ftiziatrov.pdf](http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/epid_situaciya_sezd_ftiziatrov.pdf). (In Russian).

#### Информация о авторах:

Андреевская Софья Николаевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»  
Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, 2  
Телефон: (499) 785-9091  
E-mail: andsofia@mail.ru

Смирнова Татьяна Геннадьевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»  
Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, 2  
Телефон: (499) 785-9091  
E-mail: s\_tatka@mail.ru

Ларионова Елена Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»  
Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, 2  
Телефон: (499) 785-9091  
E-mail: laronova\_lena@mail.ru

Ивахненко Оксана Игоревна, руководитель информационно-аналитического отдела ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»  
Адрес: 125252, Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, 12, БЦ «Линкор»  
Телефон: (495) 741-4989 (доб. 1187)  
E-mail: oksana.ivakhnenko@nearmedic.ru

Новоселова Елена Александровна, руководитель сектора медицинской информации ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»  
Адрес: 125252, Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, 12, БЦ «Линкор»  
Телефон: (495) 741-4989 (доб. 1433)  
E-mail: elena.novoselova@nearmedic.ru

Шевкун Наталия Александровна, кандидат биологических наук, руководитель сектора «Лекарственные средства» Департамента по развитию проектов ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»  
Адрес: 125252, Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, 12, БЦ «Линкор»  
Телефон: (495) 741-4989 (доб. 3871)  
E-mail: nataliya.shevkun@nearmedic.ru

#### Information about authors:

Sof'ya N. Andreevskaya, PhD, Senior Researcher, Microbiology Department, Central TB Research Institute  
Address: 2 Yauzskaya alley, Moscow, 107564, Russian Federation  
Phone: (499) 785-9091  
E-mail: andsofia@mail.ru

Tatiana G. Smirnova, PhD, Senior Researcher, Microbiology Department, Central TB Research Institute  
Address: 2 Yauzskaya alley, Moscow, 107564, Russian Federation  
Phone: (499) 785-9091  
E-mail: s\_tatka@mail.ru

Elena E. Larionova, PhD, Senior Researcher, Microbiology Department, Central TB Research Institute  
Address: 2 Yauzskaya alley, Moscow, 107564, Russian Federation  
Phone: (499) 785-9091  
E-mail: laronova\_lena@mail.ru

Oksana I. Ivakhnenko, Head of Information and Analytics Unit, «NEARMEDIC PLUS» LLC  
Address: 125252, Moscow, Aviakonstruktora Mikoyana Str., 12, Building A, 1<sup>st</sup> hall  
Phone: (495) 741-4989  
E-mail: oksana.ivakhnenko@nearmedic.ru

Elena A. Novoselova, Head of Medical Information Unit, «NEARMEDIC PLUS» LLC  
Address: 125252, Moscow, Aviakonstruktora Mikoyana Str., 12, Building A, 1<sup>st</sup> hall  
Phone: (495) 741-4989  
E-mail: elena.novoselova@nearmedic.ru

Natalia A. Shevkun, PhD, Head of Drug Unit Project office, «NEARMEDIC PLUS» LLC  
Address: 125252, Moscow, Aviakonstruktora Mikoyana str., 12, Building A, 1<sup>st</sup> hall  
Phone: (495) 741-4989  
E-mail: nataliya.shevkun@nearmedic.ru

## НОВОСТИ НАУКИ

### Наблюдение за устойчивостью морских бактерий

Учеными Гонконгского Политехнического Университета было установлено, что морская бактерия *Vibrio parahaemolyticus* обладает геном устойчивости к антибиотикам. Ранее этот ген находили у неморских микробов и никогда до этого не обнаруживали у *V. parahaemolyticus*. По-видимому, ген мог перейти от других бактериальных видов. Дальнейшие исследования показали, что плазмиду, содержащую данный ген, можно перемещать в неродственный вид *E. coli* – из которого, быть может, она перешла в исходное положение.

Li R., Ye L., Zheng Z., Chan E.W.C., Chen S.

*Genetic Characterization of a bla VEB-2 -carrying plasmid in Vibrio parahaemolyticus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2016 Sep 19. pii: AAC.01749-16. doi:10.1128/AAC.01749-16*

### Ловля бактерий в темноте

Ученые из Университета города Пурдье (США) сумели определить загрязнение пищи бактериями с помощью нового метода детекции: по свечению клеток *E. coli*. Ученые изменили специфичный для бактерии бактериофаг, после заражения которым клетки *E. coli* начинают светиться. Этот новый метод позволяет за короткое время распознать степень испорченности пищи лучше традиционных методов. Это дает возможность предотвратить распространение опасных пищевых компонентов.

Zhang D., Coronel-Aguilera C.P., Romero P.L., Perry L., Minocha U., Rosenfield C., et al.  
*The Use of a Novel NanoLuc -Based Reporter Phage for the Detection of Escherichia coli O157:H7. Scientific Reports. 2016; 6, 33235. doi:10.1038/srep33235*

# Генотипирование и оценка вирулентности на мышинной модели штамма *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью, выделенного в Российской Федерации

И.А.Дятлов<sup>1</sup>, В.Д.Потапов<sup>1</sup>, Т.И.Комбарова<sup>1</sup>, М.В.Фурсов<sup>2</sup>, А.Г.Богун<sup>1</sup>,  
Т.Н.Мухина<sup>1</sup>, А.А.Кисличкина<sup>1</sup>, Л.А.Кадникова<sup>1</sup>, С.А.Благодатских<sup>1</sup>,  
Е.А.Ганина<sup>1</sup>, Т.П.Морозова<sup>1</sup>, Л.В.Домотенко<sup>1</sup>, К.В.Детушев<sup>1</sup>, М.В.Храмов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН», Москва, Российская Федерация

Изучены культурально-морфологические и молекулярно-генетические особенности клинического штамма туберкулезного микроба *Mycobacterium tuberculosis* «Ростов», выделенного в России в 2013 г. из мокроты больного туберкулезом человека. Данный штамм отнесен к категории штаммов возбудителя туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ или XDR-ТБ), поскольку он устойчив к четырем противотуберкулезным препаратам первого ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу) и к четырем противотуберкулезным препаратам второго ряда (амикацину, канамицину, капреомицину, офлоксацину). На основании генотипирования методами MIRU-VNTR, сполитипирования и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов на основе IS6110-элемента определена принадлежность штамма к генетическому семейству Beijing (Пекин), которое является преобладающим на территории Российской Федерации. Экспериментально установлена высокая вирулентность штамма *M. tuberculosis* «Ростов» для мышей линии C57BL, превышающая таковую для лабораторного вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, что выражалось в более быстром и необратимом истощении животных; в большей степени обсемененности микобактериями органов экспериментальных животных; в более выраженной гистологической картине патологических изменений внутренних органов животных. Важной особенностью данного штамма является его более быстрый рост на жидких питательных средах по сравнению с лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

**Ключевые слова:** XDR туберкулез, ШЛУ-ТБ, *Mycobacterium tuberculosis*, модель туберкулеза, линия мышей C57BL, патогенез туберкулеза, Beijing, MIRU-VNTR-генотипирование, сполитипирование, RFLP-IS6110-типирование

**Для цитирования:** Дятлов И.А., Потапов В.Д., Комбарова Т.И., Фурсов М.В., Богун А.Г., Мухина Т.Н., Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Благодатских С.А., Ганина Е.А., Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Детушев К.В., Храмов М.В. Генотипирование и оценка вирулентности на мышинной модели штамма *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью, выделенного в Российской Федерации. Бактериология. 2017; 2(1): 35–45. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-35-45

## Genotyping and assessment of virulence on a mouse model of highly drug-resistant strain *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the Russian Federation

I.A.Dyatlov<sup>1</sup>, V.D.Potapov<sup>1</sup>, T.I.Kombarova<sup>1</sup>, M.V.Fursov<sup>2</sup>, A.G.Bogun<sup>1</sup>,  
T.N.Mukhina<sup>1</sup>, A.A.Kislichkina<sup>1</sup>, L.A.Kadnikova<sup>1</sup>, S.A.Blagodatskikh<sup>1</sup>,  
E.A.Ganina<sup>1</sup>, T.P.Morozova<sup>1</sup>, L.V.Domotenko<sup>1</sup>, K.V.Detushev<sup>1</sup>, M.V.Khramov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation;

<sup>2</sup>Fundamental Bases of Biotechnology of RAS, Moscow, Russian Federation

### Для корреспонденции:

Потапов Василий Дмитриевич, доктор биологических наук, заведующий отделом переподготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский район, п. Оболенск

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: potapov@obolensk.org

Статья поступила 15.11.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

### For correspondence:

Vasily D. Potapov, Sc.D., Head of the Department for Retraining and Improvement of Specialists of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

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

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: potapov@obolensk.org

The article was received 15.11.2016, accepted for publication 15.03.2017

Cultural-morphological and molecular genetic properties of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strain «Rostov» collected from sputum of TB patient in Russia in 2013 were studied. This strain was classified as XDR-TB, because it was resistant to four first-line anti-TB drugs (isoniazid, rifampicin, streptomycin, and ethambutol) and four second-line anti-TB drugs (amikacin, kanamycin, capreomycin, ofloxacin). *M. tuberculosis* strain «Rostov» was attributed to prevalent in Russian Federation TB genetic family Beijing by genotyping using MIRU-VNTR, spoligotyping, and IS6110-based restriction fragment length polymorphism methods. *M. tuberculosis* strain «Rostov» is virulent for mouse line C57BL, higher than laboratory strain *M. tuberculosis* H37Rv. It was manifested in faster and irreversible depletion of animals; more mycobacteria dissemination in the bodies of experimental animals; in more severe pathological changes of animal parenchymal organs. An important feature of this strain is its faster growth on nutrient broth compared to *M. tuberculosis* H37Rv laboratory strain.

**Keywords:** XDR-TB, *Mycobacterium tuberculosis*, *tuberculosis animal model*, *mouse line C57BL*, *TB pathogenesis*, *Beijing*, *MIRU-VNTR-genotyping*, *spoligotyping*, *RFLP-IS6110-typing*

**For citation:** Dyatlov I.A., Potapov V.D., Kombarova T.I., Fursov M.V., Bogun A.G., Mukhina T.N., Kislichkina A.A., Kadnikova L.A., Blagodatskikh S.A., Ganina E.A., Morozova T.P., Domotenko L.V., Detushev K.V., Khramov M.V. Genotyping and assessment of virulence on a mouse model of highly drug-resistant strain *Mycobacterium tuberculosis* isolated in the Russian Federation. *Bacteriology*. 2017; 2(1): 35–45. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-35-45

**Т**уберкулез (ТБ, ТВ) является одной из 10 основных причин смерти во всем мире. Эпидемия туберкулеза в последние десятилетия является одной из важнейших проблем для здравоохранения во всем мире. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ, WHO), в 2015 г. в мире зафиксировано 10,4 млн случаев вновь выявленного ТБ, в том числе у 5,9 млн (56%) мужчин, 3,5 млн (34%) женщин, 1,0 млн (10%) детей. Больше половины (60%) новых случаев ТБ выявлено в шести странах: Индии, Индонезии, Китае, Нигерии, Пакистане и Южно-Африканской Республике [1]. Высокий уровень заболеваемости ТБ сочетается с высоким уровнем смертности – в среднем по миру он составляет 16%, в Африке – 46%, в Юго-Восточной Азии – 24%, в Европе – 3,7%. В 2015 г. умерли от туберкулеза 1,4 млн человек, а от туберкулеза в сочетании ВИЧ-инфекцией – еще 0,4 млн человек. Несмотря на то, что смертность от ТБ в 2015 г. снизилась на 22% по сравнению с 2000 г., туберкулез остается в списке 10 самых смертоносных инфекций в мире [2]. В отчете ВОЗ 2016 г. с удовлетворением отмечается, что в 2015 г., в результате активных действий по профилактике и лечению ТБ, достигнут прогресс, выразившийся в снижении заболеваемости ТБ на 1,5% по сравнению с 2014 г. В Российской Федерации данный показатель составил 4,2% [1].

Однако все больше нарастает значимость туберкулезной инфекции, вызванной множественно-устойчивыми вариантами возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*, которые устойчивы к противотуберкулезным препаратам первого ряда изониазиду и рифампицину. В 2015 г. в мире зафиксировано 480 тыс. случаев вновь диагностированного множественно-устойчивого ТБ (MDR-TB) и, кроме того, 100 тыс. впервые выявленного рифампицин-устойчивого ТБ (RR-TB). Вклад MDR-TB и RR-TB очень высок среди заболеваний ранее леченного туберкулеза: в целом по миру этот показатель составляет 58%, в Юго-Восточной Азии – 67%, в Западной Океании – 62%, в Европе – 52%, в Африке – 33%, в двух Америках – 32% [2]. Более 60% MDR-TB и RR-TB зарегистрировано в пяти странах: Индии, Китае, Российской Федерации, Индонезии и Нигерии. В Российской Федерации в 2016 г. у 35% госпитализированных туберкулезных пациентов выявлен MDR-TB и RR-TB, что указывает на существенный рост данного показателя по сравнению с 2014 г., когда он составлял 7% [1, 3].

Результатом продолжающейся эволюции возбудителя туберкулеза в сторону нарастания лекарственной резистентности является выявление среди штаммов MDR/RR-TB возбудителей экстремально устойчивого туберкулеза (XDR-TB), устойчивых к противотуберкулезным препаратам не только первого ряда, но дополнительно устойчивых к фторхинолонам и, по крайней мере, к одному препарату второго ряда – капреомицину, канамицину или амикацину. Наибольшее количество XDR-TB в 2015 г. зарегистрировано в Индии (2130), Украине (1206), Российской Федерации (1205) и Южной Африке (719). Средний показатель доли XDR-TB среди MDR-TB в мире существенно не изменился за последние годы – 9,7% в 2014 г., 9,0% в 2013 г. и 9,5% в 2015 г. [1].

Опасность нарастания множественной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза усугубляется тем, что она коррелирует с увеличением устойчивости данного патогена к действию иммунной системы макроорганизма. Показано, что некоторые MDR-TB штаммы вызывают патологический процесс, обладающий уникальными особенностями, а именно, отмечается отрицательное влияние на развитие иммунитета против туберкулезной инфекции [4]. Кроме того, отмечено, что MDR-TB и XDR-TB характеризуются повышенной заболеваемостью [5] и летальностью: 40% для MDR-TB и 60–70% для XDR-TB в эндемичных странах при использовании традиционных режимов лечения, что является огромной проблемой здравоохранения [6, 7].

На основании данных филогенетики ТБ, в Российской Федерации циркулируют несколько генотипов *M. tuberculosis*: (1) доминантное семейство Beijing, характеризующееся высоким уровнем вирулентности и лекарственной устойчивости [8]; (2) Латино-Американско-Средиземноморское (LAM) семейство, второе по величине в Российской Федерации и ассоциированное с MDR-TB в некоторых регионах; и (3) Уральское семейство, эндемичное для России, которое считается менее трансмиссивным и менее лекарственно устойчивым [9].

**Цель данной работы** – изучение культурально-морфологических и молекулярно-генетических особенностей клинического штамма туберкулезного микроба, выделенного в России в 2013 г., определение его уровня лекарственной устойчивости и принадлежности к генетическому семейству, сравнение его патогенетических свойств с таковыми лабораторного вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37RV на мышинной модели туберкулеза.

## Материалы и методы

### Выделение культуры *M. tuberculosis*

Образцы мокроты обрабатывали 10% раствором фосфата натрия трехзамещенного и перемешивали со стеклянными бусами на приборе Vortex (Scientific Industries, США) в течение 10 мин, затем инкубировали при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 18–20 ч. Суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Образовавшийся осадок обрабатывали 6% раствором соляной кислоты (до pH 7,0), а затем – дистиллированной водой. Отмытый осадок высевали на питательные среды Левенштейна–Йенсена (ФБУН ГНЦПМБ, Оболенск, Россия), Финна 2 (ФБУН ГНЦПМБ, Оболенск, Россия) и среду Миддлбрук 7Н10 (BD, США). Посевы инкубировали при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 28 сут. Выросшие колонии микроскопировали, готовили мазки и окрашивали по Цилю–Нильсену.

### Штаммы бактерий и культивирование

Штамм *Mycobacterium tuberculosis* «Ростов» выделен из образца мокроты мужчины 35 лет с диагнозом «туберкулез легких», полученного из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Дагестан» в ноябре 2013 г., депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ–Оболенск» под номером В-7601. Вирулентный штамм *M. tuberculosis* H37Rv получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ–Оболенск». Культуры возбудителя туберкулеза выращивали на плотных питательных средах, а также в модифицированной жидкой питательной среде Middelbrook 7Н9 (Himedia, Индия) с добавкой 10% АСД (BD, США) и 0,05% Твина 80с азрацией в атмосферном воздухе в пластиковых флаконах объемом 100–500 мл в течение 21 дня при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Культуры выращивали до оптической плотности, соответствующей  $5 \times 10^7$ – $10^8$  КОЕ/мл, делили на аликвоты по 1 мл и хранили в 10% глицерине при температуре  $-70^\circ\text{C}$ . Жизнеспособность культур при хранении определяли высевками на плотную питательную среду Middelbrook 7Н11 (Himedia, Индия) с 20% сыворотки крупного рогатого скота.

### Видовая идентификация

Микобактерии идентифицировали на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Для этого использовали две методики – экстракцию белков трифторуксусной кислотой и экстракцию белков муравьиной кислотой, в сочетании с дезинтеграцией бактериальных клеток циркониевыми/кварцевыми шариками.

### Определение биохимических свойств

Нитратредуктазную активность и способность к росту на среде с тиафенкарбоксигидразидом определяли с помощью «Набора питательных сред для ускоренного определения лекарственной чувствительности и первичной идентификации микобактерий туберкулеза» (ТБ тест-набор), регистрационный № ФСР 2007/01366, с. 1/14 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

### Определение чувствительности к антибактериальным препаратам

Лекарственную чувствительность культур микобактерий к противотуберкулезным препаратам 1-го ряда изониазиду (1,0 мг/л), рифампицину (40,0 мг/л), стрептомицину (10,0 мг/л) и этамбутолу (2,0 мг/л) и к противотуберкулезным препара-

там 2-го ряда амикацину (30,0 мг/л), канамицину (30,0 мг/л), капреомицину (30,0 мг/л) и офлоксацину (3,0 мг/л) определяли с помощью «Набора питательных сред для ускоренного определения лекарственной чувствительности и первичной идентификации микобактерий туберкулеза» (ТБ тест-набор), регистрационный № ФСР 2007/01366, с. 1/14 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и «Набора питательных сред для диагностики XDR-туберкулеза» (XDR-тест), регистрационный № РЗН 2013/902, с. 2/14 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), в соответствии с инструкцией по применению.

### Биоэтические требования

Все протоколы экспериментов на животных одобрены Биоэтическим комитетом ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (Разрешение № VP-2016/8) и приведены в соответствии с Руководством по обработке, уходу и защите лабораторных животных Европейского Союза от 02.07.2007 г. ([http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/home\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm)).

### Животные

Самки мышей линии С57BL (возраст 7–8 нед, вес 20–22 г) получены из Питомника лабораторных животных ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН. Животных содержали в поликарбонатных клетках при режиме освещения с 7:00 до 19:00 в виварном помещении уровня безопасности BSL3 с поддержанием температуры на уровне  $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$  и влажности на уровне  $(50 \pm 10)\%$ . Грызуны получали водопроводную воду и мышинный комбикорм РК-120 (Лабораторкорм, Россия) *ad libitum* на протяжении всего исследования. Состояние здоровья животных проверяли, по крайней мере, два раза в день. В экспериментах использовали минимальное количество животных, необходимое для обеспечения статистической достоверности. Животные были разделены на группы случайным образом. В данном исследовании использованы гуманные методы умерщвления инфицированных животных – эвтаназия газом  $\text{CO}_2$  с последующей цервикальной дислокацией, осуществляемые хорошо подготовленным персоналом.

### Заражение лабораторных животных

Суспензию клеток микобактерий, замороженную при температуре минус  $70^\circ\text{C}$ , размораживали при комнатной температуре и гомогенизировали инсулиновым шприцем в асептических условиях с соблюдением правил техники безопасности. Готовили десятикратные разведения суспензии в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) с 0,05% Твина 80. Концентрацию микобактерий в суспензии определяли высевом на плотную питательную среду Middelbrook 7Н11 (Himedia, Индия) с 20% сыворотки крупного рогатого скота. Заражение животных осуществляли внутривенным введением суспензии клеток микобактерий в боковую хвостовую вену в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/мышь [10].

### Определение микобактериальной нагрузки в органах животных

Патологоанатомическое вскрытие животных и макроскопическое описание проводили, соблюдая правила асептики. Паренхиматозные органы (печень, селезенку и легкие) гомогенизировали в стерильных ступках, добавляя 1 мл ЗФР на один орган, высевали 10-кратные разведения на плотную питательную среду Middelbrook 7Н11 (Himedia, Индия), со-

державшую 20% сыворотки КРС. Для подавления посторонней микрофлоры при высеве из исходного разведения гомогената в суспензию добавляли соляную кислоту до концентрации 3%. На поверхность плотной питательной среды наносили 0,1 мл суспензии соответствующего разведения и тщательно растирали шпателем. Засеянные чашки помещали в полиэтиленовые пакеты и герметизировали. Инкубацию проводили при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 25 дней. Подтверждение специфичности выросших колоний микобактерий осуществляли с помощью окрашивания по Цилю-Нильсену и световой микроскопии. Расчет концентрации колониеобразующих единиц (КОЕ) производили методом подсчета колоний в соответствующем разведении гомогената органа. Экспериментальную погрешность определяли для каждого ряда из 5 чашек. Результаты обрабатывали статистически, с указанием среднего и относительного отклонений.

#### Гистологические исследования

Паренхиматозные органы экспериментальных животных фиксировали в растворе 10% нейтрального формалина («БиоХим-НН», Россия), обезвоживали в растворах этанола и бутанола с повышающимися концентрациями, пропитывали парафином и заливали в парафиновые блоки, готовили срезы на микротоме Reichert-Jung (Reichert-Jung, Германия) и помещали на предметные стекла. Срезы депарафинировали в ксилоле, промывали в растворах спиртов с понижающимися концентрациями, окрашивали гематоксилин-эозином и заключали в бальзам. Анализ препаратов проводили на микроскопе Nikon Eclipse 80i (Nikon, Япония) с использованием цифровой камеры Nikon DS-U2 (Nikon, Япония).

#### Выделение хромосомной ДНК

Хромосомную ДНК *M. tuberculosis* выделяли с помощью СТАВ-метода. Бактериальную культуру (2–3 петли) переносили в микроцентрифужную пробирку «Eppendorf» с 400 мкл буферного раствора  $1 \times \text{TE}$  (10 mM Tris, pH 8,0 и 1 mM EDTA). Затем в пробирку добавляли 50 мкл лизоцима (10 мг/мл) и инкубировали в течение 2 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$ . К полученной суспензии добавляли 75 мкл раствора SDS/протеиназа К (70 мкл 10% SDS и 5 мкл протеиназы К), 100 мкл 5M NaCl и 100 мкл раствора СТАВ/NaCl (4,1 г NaCl, 10 г СТАВ, 80 мл дистиллированной воды). Полученную смесь трясали до молочно-белой консистенции и инкубировали в течение 10 мин при температуре  $65^\circ\text{C}$ . После инкубации в пробирку добавляли 750 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24 : 1), трясали 10 с и центрифугировали при 30 000 g в течение 5 мин. Затем надосадочную жидкость, содержащую ДНК, отбирали в новую пробирку, добавляли 450 мкл изопропилового спирта и инкубировали в течение 10 мин на льду. Далее пробирку центрифугировали 15 мин при комнатной температуре при 30 000 g и супернатант удаляли при помощи автоматической пипетки. Далее к осадку добавляли 1 мл 70%-ного перегнанного этанола и центрифугировали в течение 15 мин при температуре  $+4^\circ\text{C}$  при 20 000 g. Супернатант удаляли, осадок высушивали при комнатной температуре и растворяли в 20 мкл дистиллированной воды.

#### MIRU-VNTR-типирование

Для генотипирования штамма *M. tuberculosis* «Ростов» использовали вариант метода MIRU-VNTR-типирования, основанный на анализе 35 локусов хромосомы возбудителя туберкулеза [11]. ПЦП проводили на амплификаторе DNA

Engine Dyad («Bio-Rad», США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH = 8,8, 0,08% Nonidet P40, 1,5–3,0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM каждого дезоксирибонуклеотида, 0,4 мкМ каждого олигонуклеотида, 1 ед. активности рекомбинантной Taq-полимеразы (Хеликон, Россия). Режим амплификации:  $95^\circ\text{C}$  – 10 мин; 30 циклов:  $95^\circ\text{C}$  – 1 мин,  $59^\circ\text{C}$  – 1 мин,  $72^\circ\text{C}$  – 2 мин;  $72^\circ\text{C}$  – 10 мин. Размер ампликона определяли с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле при окрашивании бромистым этидием, с использованием маркеров размеров ДНК «O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder» (Fermentas, Литва) и 50 Base-Pair Ladder (Amersham Pharmacia Biotech Inc, США).

#### Филогенетический анализ

Филогенетический анализ проводили с использованием международной базы данных VNTRPLUS (<http://www.miruvntrplus.org/>), содержащей информацию о 186 штаммах *M. tuberculosis*, выделенных в разных странах мира, а также с использованием базы данных отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», содержащей данные о 330 штаммах *M. tuberculosis*, выделенных на территории Тульской области в 2002–2003 гг.

#### Сполиготипирование

Сполиготипирование штамма *M. tuberculosis* «Ростов» проводили по стандартной методике [12]. По 20 нг хромосомной ДНК амплифицировали с праймерами DRa-5'-Biotin-ggttttggtctgacgac-3' и DRb-5'-ccgagaggggacgaaac-3' (Isogen Netherlands). ПЦП-смесь готовили в объеме 50 мкл: прямой и обратный праймеры – по 20 пмоль; по 0,2 mM каждого dNTP (Fermentas, Литва); 10  $\times$  Taq буфер с KCl и 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Fermentas, Литва); Taq ДНК-полимераза – 5 ед./мкл (Fermentas, Литва); хромосомная ДНК – 20 нг. Реакцию амплификации проводили в термоциклере DNA Engine Dyad (Bio-Rad, США) при следующем режиме: начальная денатурация при  $96^\circ\text{C}$  – 3 мин; затем 30 циклов, включающих денатурацию при  $96^\circ\text{C}$ , – 1 мин, отжиг при  $55^\circ\text{C}$  – 1 мин, элонгацию при  $72^\circ\text{C}$  – 30 с; дополнительный прогрев при  $72^\circ\text{C}$  – 5 мин. Полученные в результате реакции ПЦП-продукты прогревали с буфером  $2 \times \text{SSPE}/0,1\%$  SDS в течение 10 мин при температуре  $99^\circ\text{C}$  и вносили в каждый слот миниблоттера Miniblotter 45 (Immunelectrics, Великобритания), в котором находилась мембрана с нанесенными на нее 43 спейсерами (Isogen, Нидерланды). Гибридизацию проводили в течение часа при температуре  $60^\circ\text{C}$ , на горизонтальной поверхности, не допуская сдвигов мембраны и смешивания образцов в соседних слотах. Затем образцы удаляли из слотов миниблоттера и мембрану дважды отмывали от непрореагировавших амплификатов при температуре  $60^\circ\text{C}$  в 250 мл буфера  $2 \times \text{SSPE}/0,5\%$  SDS, предварительно нагретого до такой же температуры. Затем мембрану инкубировали в течение 1 ч при температуре  $42^\circ\text{C}$  в буфере  $2 \times \text{SSPE}/0,5\%$  SDS с SA-HRP (Amersham Biosciences, Великобритания), после чего ее дважды отмывали при температуре  $42^\circ\text{C}$  в 250 мл буфера  $2 \times \text{SSPE}/0,5\%$  SDS и при комнатной температуре в буфере  $2 \times \text{SSPE}$ . Результаты выявляли с помощью хемилюминесцентной реакции в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (Amersham Biosciences, Великобритания). В качестве контрольных образцов использовали ДНК штаммов *M. tuberculosis* H37Rv и *M. bovis* BCG.

### ДНК-фингерпринтинг на основе IS6110-элемента

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) на основе IS6110-элемента осуществляли по методу [14]. В качестве зонда использовали ПЦР-продукт инсерционного элемента IS6110 (245 п. о.) штамма H37Rv *M. tuberculosis*. Реакцию амплификации проводили в термоциклере DNA Engine Dyad (Bio-Rad, США). Наличие продукта амплификации проверяли с помощью метода электрофореза в 1 %-ном агарозном геле с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием. В качестве стандарта молекулярных масс использовали маркеры ДНК размером 100 п. о. (Amersham Biosciences, Великобритания). В результате амплификации получали ПЦР-продукт размером 245 п. о. Амплифицированный фрагмент очищали с помощью набора DNA Extraction kit (Fermentas, Литва) согласно инструкции фирмы-изготовителя. По 1–1,5 мкг образцов хромосомной ДНК, выделенных из культур *M. tuberculosis*, расщепляли с помощью фермента эндонуклеазы рестрикции PvuII (Fermentas, Литва) в течение 3 ч при температуре 37°C. Для разделения фрагментов рестрикции, различающихся по молекулярной массе, использовали метод электрофоретического разделения в 1 %-ном агарозном геле при напряжении 1,0 В/см в течение 18 ч. Затем ДНК-фрагменты переносили на нейлоновую мембрану Hybond N+ (Amersham Biosciences, Великобритания) с помощью вакуумного блоттера, модель 785 (BioRad, США) в течение 4 ч при давлении 15 см рт. ст. ДНК-фрагменты «пришивали» к мембране с помощью прибора UV Crosslinker (Crosslinker, США). Затем мембрану переносили в стакан для гибридизации с подогретым до температуры 42°C буфером (30 мл золотого гибридизационного буфера, 0,5 М NaCl и 5% блокирующего реагента (Amersham Biosciences, Великобритания). Стакан помещали в печь для гибридизации (Amersham Biosciences, Великобритания) и после инкубации в течение 1 ч добавляли меченый зонд. Мечение зонда осуществляли с помощью ECL™ системы, согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (Amersham Biosciences, Великобритания). Гибридизацию проводили при темпе-

ратуре 42°C в течение 16 ч. По окончании гибридизации мембрану отмывали буферами (0,4 М SDS/0,1 × SSC и 2 × SSC). Хемилюминесцентную детекцию ДНК-фрагментов осуществляли согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (Amersham Biosciences, Великобритания). Полученные ПДРФ-профили обрабатывали с помощью программы GelComparII, version 2.5 (Windows 98, Бельгия).

### Статистическая обработка данных

Среднее значение и доверительные интервалы рассчитывали с помощью статистической офисной программы Microsoft Excel, достоверность различий определяли по параметрическому критерию Стьюдента для  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### Культурально-морфологические свойства штамма *M. tuberculosis* «Ростов»

На средах Левенштейна–Йенсена и Финна 2 штамм *M. tuberculosis* «Ростов» формировал сухие морщинистые колонии цвета слоновой кости, на среде Миддлбрук 7H10 колонии формировались более плоскими и светлыми. В мазках, окрашенных по Цилю–Нильсену, были выявлены мелкие палочки, окрашенные в красный цвет, расположенные под углом друг к другу и в виде скоплений. Видовая идентификация с помощью технологии MALDI в двух вариантах пробоподготовки – при экстракции бактериальных белков трифторуксусной кислотой и при экстракции белков муравьиной кислотой, с использованием циркониевых/кварцевых шариков, показала принадлежность выделенного штамма к микобактериям туберкулезного комплекса. Уровень достоверности (скор) составил 1,5–1,7.

Показано, что штамм *M. tuberculosis* «Ростов» характеризуется более быстрым размножением клеток по сравнению с лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. Это установлено с помощью сравнения средних показателей оптической плотности жидкой культуры двух штаммов в течение 30 дней (рис. 1) и количества КОЕ в этих культурах (рис. 2).

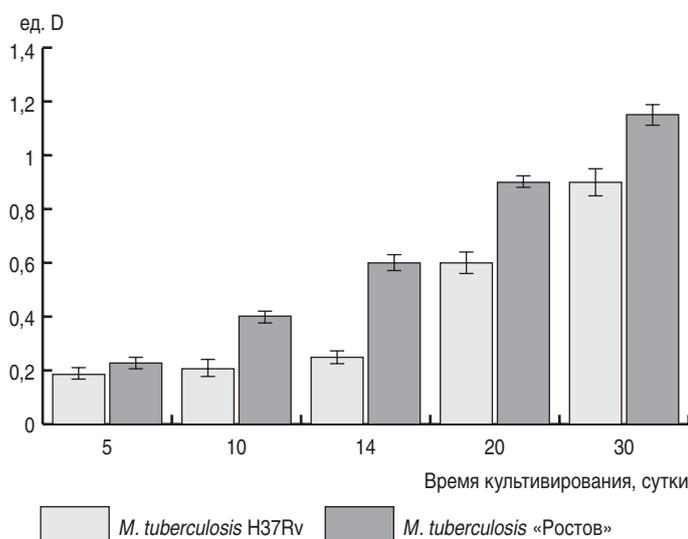


Рис. 1. Сравнение средних показателей оптической плотности при росте *M. tuberculosis* H37Rv и клинического изолята «Ростов» в жидкой питательной среде 7H9.

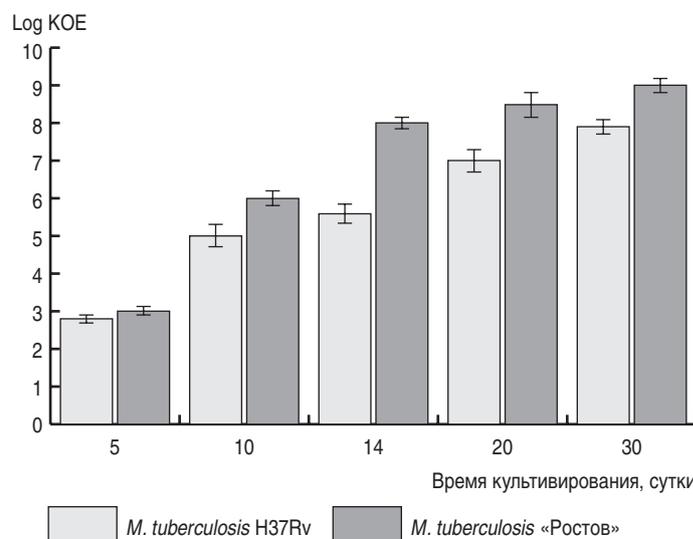


Рис. 2. Сравнение средних показателей количества КОЕ при росте клеток *M. tuberculosis* H37Rv и клинического изолята «Ростов» в жидкой питательной среде 7H9.

### Определение биохимической активности и лекарственной чувствительности штамма *M. tuberculosis* «Ростов»

Культивирование выделенного в данном исследовании клинического штамма *M. tuberculosis* «Ростов» в течение 7 сут в реакционных емкостях ТБ тест-набора и ХDR-теста, разработанных в отделе питательных сред ФБУН ГНЦ ПМБ, показало, что данный штамм обладает нитратредуктазной активностью, свойственной возбудителю туберкулеза, а также способен расти на среде с тиафен-карбоксигидразидом, что также является характерной особенностью *M. tuberculosis*. Кроме того, выявлена устойчивость данного штамма к четырем противотуберкулезным препаратам 1-го ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу) и четырем противотуберкулезным препаратам 2-го ряда (амикацину, канамицину, капреомицину, офлоксацину). На этом основании данный штамм отнесен в категорию с широкой лекарственной устойчивостью.

#### Динамика изменения веса тела зараженных мышей

Показатель истощенности животных в мышинных моделях экспериментального туберкулеза является надежным признаком динамики патогенетического процесса. Результаты, представленные на рисунке 3, показывают необратимое и сильное истощение животных, зараженных клиническим штаммом «Ростов», по сравнению с животными, зараженными лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv (мыши групп 2 и 3). По резкому уменьшению веса животных, зараженных клиническим изолятом «Ростов», можно сделать вывод о более выраженной патогенности данного штамма, по сравнению с лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

#### Изучение патогенности штаммов *M. tuberculosis* H37Rv и *M. tuberculosis* «Ростов» на мышинной модели туберкулеза

Для изучения патогенности исследуемого клинического варианта *M. tuberculosis* в экспериментах была использована мышинная модель. Микобактерии туберкулеза патогенны

для мышей, в особенности для линии C57BL, на которой были проведены эксперименты.

На рисунке 4 приведены экспериментальные данные по сравнению гибели мышей линии C57BL при заражении контрольным *M. tuberculosis* H37Rv и клиническим вариантом *M. tuberculosis* «Ростов».

Эксперименты показали, что клинический штамм имеет большую вирулентность, и большинство зараженных им животных гибнут в течение первых 3 мес после инфицирования.

#### Патоморфологическая картина внутренних органов зараженных мышей линии C57BL

Внешний осмотр мышей на 30-е сутки после внутривенного заражения выявил, что наиболее характерные признаки туберкулеза имеются у мышей, зараженных клиническим штаммом *M. tuberculosis* «Ростов»: все мыши имели признаки крайнего истощения, их шерсть была тусклой, взъерошенной. Мыши, зараженные штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, имели слабо выраженную истощенность и гладкую шерсть. У мышей, зараженных лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv, наблюдали типичное протекание туберкулезного процесса с характерным изменением внутренних органов: незначительно увеличенная селезенка, ярко окрашенная; печень гладкая, интенсивно-коричневая, объем в норме; объем легких в норме, они бледно-розового цвета, с вкраплениями бледной массы (рис. 5А). Иная картина зафиксирована у мышей, зараженных клиническим штаммом «Ростов»: на вскрытии особенно выражено истощение животного; селезенка увеличена, кровенаполнена, тусклая, дряблая; печень темно-коричневого цвета с множественными узелковыми вкраплениями; легкие интенсивно гиперемизированы, с крупными узлами (рис. 5Б).

На основании внешнего осмотра органов больных животных, инфицированных клиническим штаммом, возможно сделать вывод об отличном от классического (вызванного заражением лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv) протекании патогенеза туберкулеза у мышей. Поражения

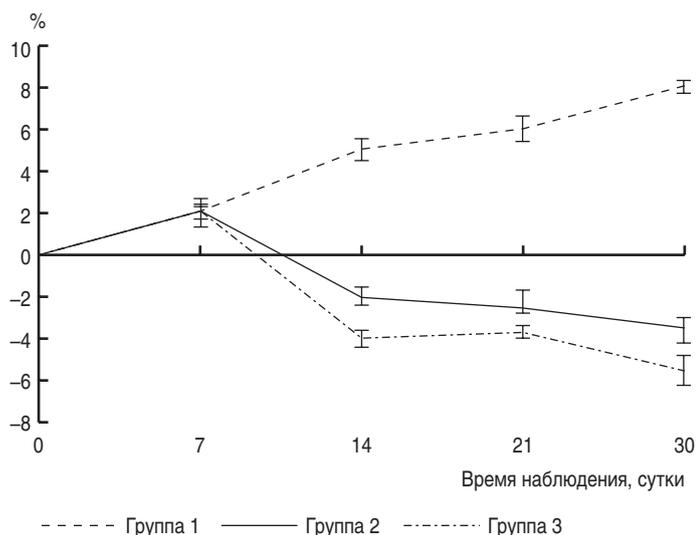


Рис. 3. Изменение веса тела мышей линии C57BL. Группа 1 – контрольная (неинфицированные мыши); группа 2 – мыши, зараженные внутривенно туберкулезным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/мышь; группа 3 – мыши, зараженные внутривенно клиническим штаммом «Ростов» в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/мышь.

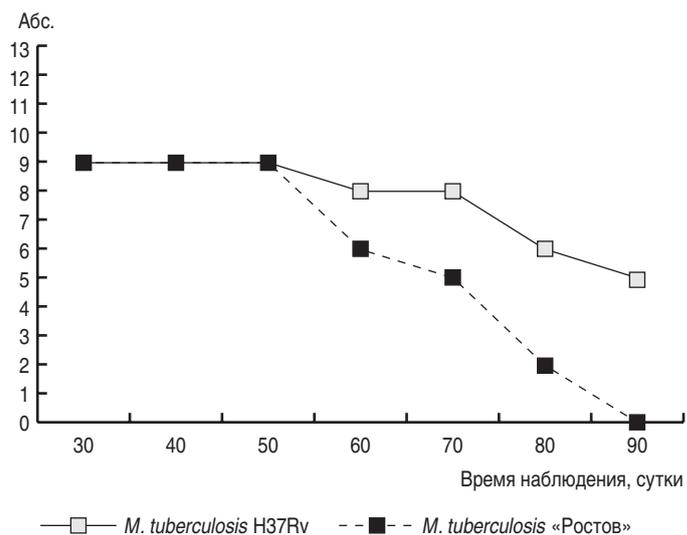


Рис. 4. Сравнение гибели мышей линии C57BL зараженных внутривенно штаммами *M. tuberculosis* H37Rv и *M. tuberculosis* «Ростов» в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ/животное.

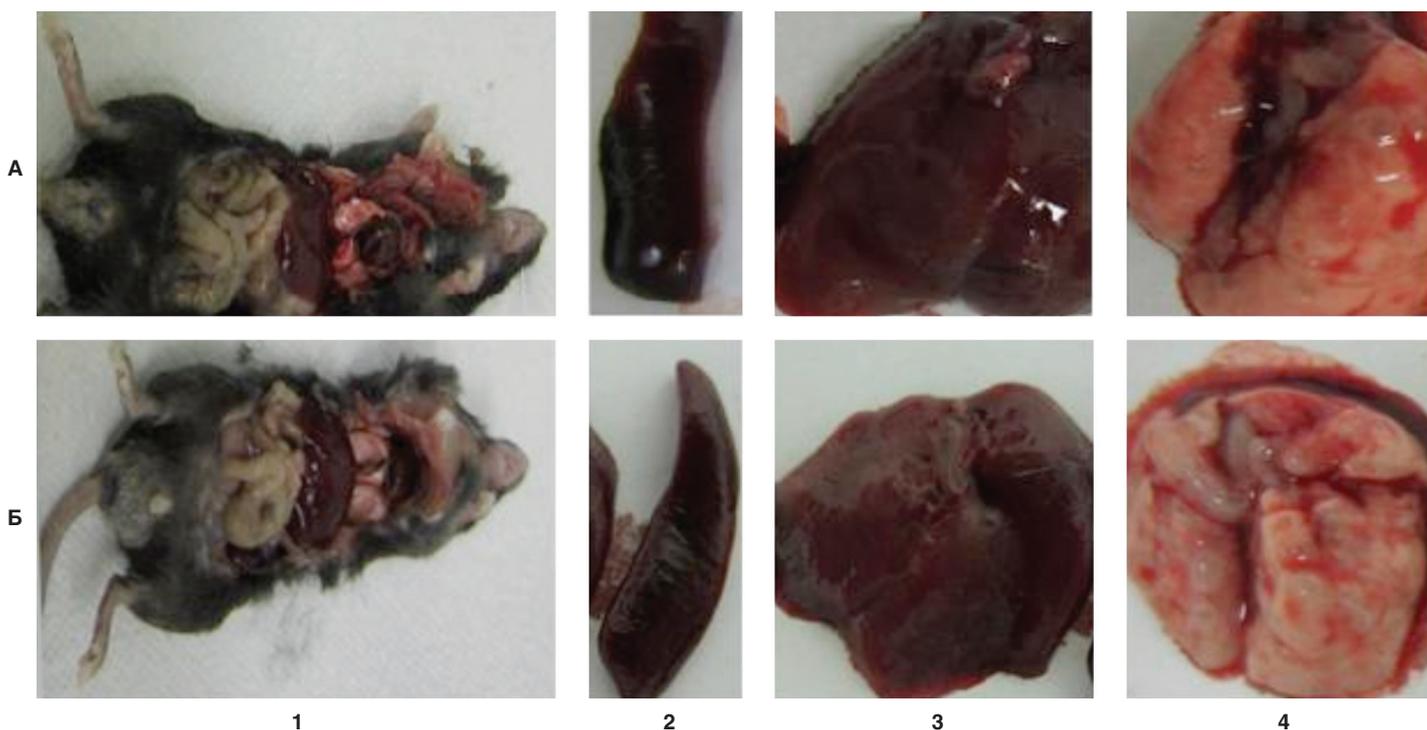


Рис. 5. Патологические изменения в органах мышей линии C57BL на 30-й день после заражения их штаммами *M. tuberculosis* H37Rv (А) и «Ростов» (Б): 1 – общий вид вскрытой мыши; 2 – селезенка; 3 – печень; 4 – легкое.

органов, вызванные этим штаммом возбудителя, выражены в большей степени.

**Обсемененность микобактериями паренхиматозных органов зараженных животных**

Наиболее важным показателем интенсивности протекания туберкулеза у мышей является показатель обсемененности легких и селезенки микобактериями туберкулеза. Экспериментальные данные по оценке количества КОЕ микобактерий в органах животных, зараженных штаммами *M. tuberculosis* H37Rv и *M. tuberculosis* «Ростов», показывают, что клинический штамм более интенсивно размножается в паренхиматозных органах экспериментальных животных (рис. 6).

**Патологические изменения паренхиматозных органов зараженных животных**

Результаты гистологического исследования мышей линии C57BL, зараженных лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе  $5 \times 10^6$  КОЕ внутривенно, показали типичную для мышинной модели картину. В легких мышей патологическая картина представлена преимущественно периваскулярными плотными инфильтратами из лимфоцитов и макрофагов, что делает возможным предположить интенсивную защитную реакцию организма животного на патоген. В печени микроскопических отклонений от нормы не выявлено. В лимфатических фолликулах белой пульпы селезенки имеет место активность центров размножения, красная пульпа заполнена большим количеством лимфоцитов и плазматических клеток, что свидетельствует об активации клеточного звена иммунитета. В паховом лимфатическом узле выявлены обширные центры пролиферации лимфоцитов. Отмечается активация макрофагов, которые образуют очаговые скопления среди лимфоцитов, что может быть интерпретировано как индукция клеточного иммунитета (рис. 7А).

При заражении животных клетками клинического штамма «Ростов» наблюдали картину гистологических срезов, четко отличающуюся от описанной выше. В отдельных участках долей легких, в результате небольшого увеличения количества макрофагов, имеет место слабо выраженное диффузное утолщение межальвеолярных перегородок, в этом случае мы наблюдаем невыраженную реакцию организма на патоген. Необходимо отметить, что возбудитель туберкулеза клинического штамма выявляется на срезе легкого в большом количестве, что также можно интерпретировать как особенность патологии легких, вызванной

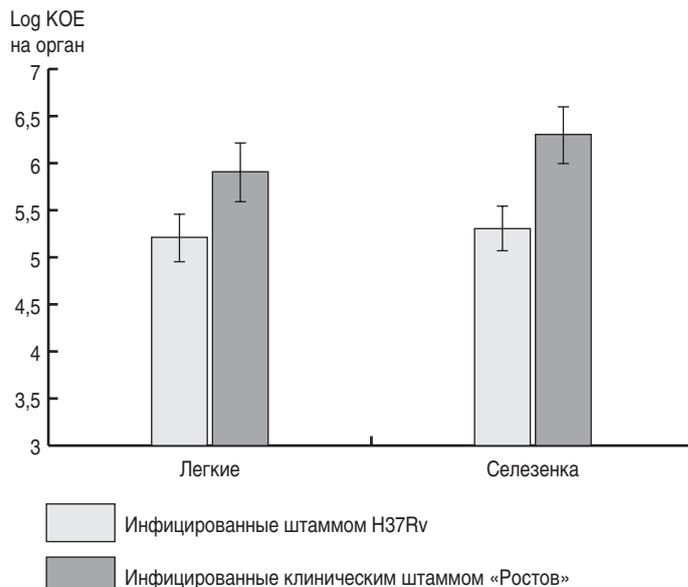


Рис. 6. Изменение количества КОЕ возбудителей туберкулеза в органах мышей линии C57BL.

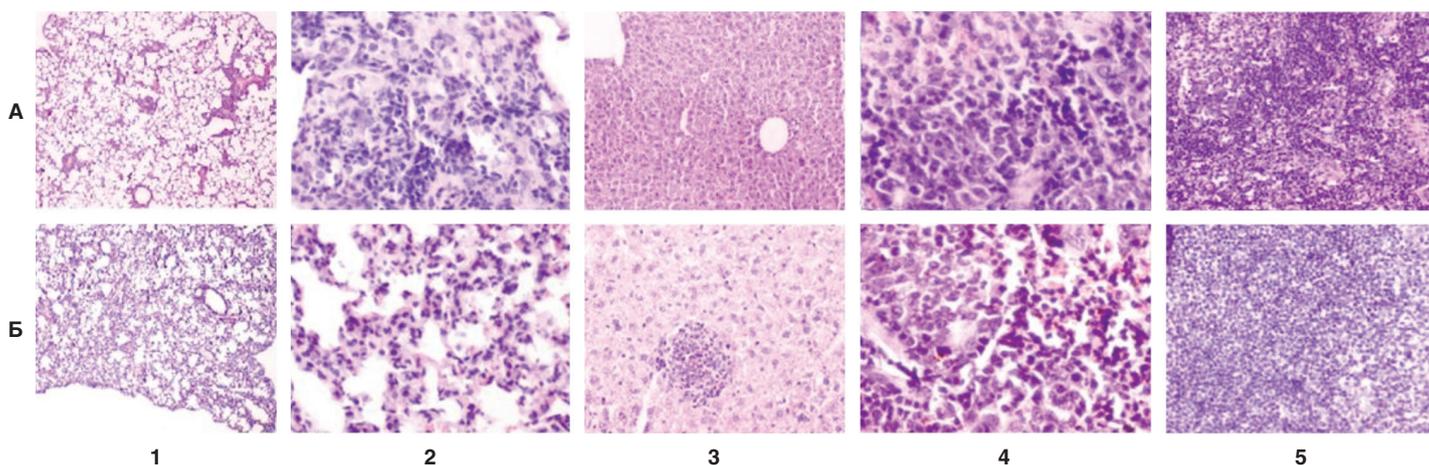


Рис. 7. Патологические изменения во внутренних органах мышей линии C57BL, инфицированных  $5 \times 10^6$  КОЕ/мышь клетками штаммов *M. tuberculosis* H37Rv (А) и «Ростов» (Б): 1, 2 – легкие, увеличение  $\times 4$  и  $\times 20$ ; 3 – печень, увеличение  $\times 10$ ; 4 – селезенка, увеличение  $\times 20$ ; 5 – лимфоузел, увеличение  $\times 20$ .

данным штаммом. В печени встречается небольшое количество гранул, в которых, наряду с макрофагами, имеется значительное количество полиморфноядерных лейкоцитов, что говорит об интенсивном размножении возбудителя и о патологическом воспалении. В красной пульпе селезенки преобладают плазматические клетки, что свидетельствует об отсутствии ответа клеточного звена иммунитета и о развитии интенсивного антительного ответа. Паховый лимфатический узел равномерно заполнен малыми лимфоцитами, т.е. не отличается от лимфатического узла интактного животного (рис. 7Б).

На основании вышеизложенных фактов можно заключить, что инфицирование мышей внутривенным введением клеток клинического штамма *M. tuberculosis* «Ростов» приводит к изменениям в легких животных, состоящим в незначительном увеличении количества макрофагов в некоторых межальвеолярных перегородках. При этом макрофаги имеют относительно узкую цитоплазму, в отличие от широкоплазменных макрофагов, инфильтрирующих легочную ткань при заражении мышей клетками штамма *M. tuberculosis* H37Rv. Инфильтрация легких мышей лимфоцитами, в случае заражения их клиническим штаммом, не выявлена. Приведенные результаты показывают, что изучаемый кли-

нический штамм возбудителя туберкулеза не активирует защитных реакций макроорганизма, в отличие от лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

**MIRU-VNTR-типирование**

Метод MIRU-VNTR-типирования выбран для типирования штамма *M. tuberculosis* «Ростов», т.к. данный метод может с высокой эффективностью применяться для анализа одного штамма. Был использован вариант метода, основанный на анализе 35 локусов, разработанный сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ в 2009–2010 гг. Данный набор включает 24 локуса, рекомендованных для анализа в медицинских учреждениях в США (стандартный расширенный набор), а также 11 дополнительных локусов, отличающихся высоким полиморфизмом. Данные для локуса VNTR 0569 получены не были, поскольку размер полученного ампликона не позволял установить количество повторов в локусе (таблица).

Филогенетический анализ, проведенный с использованием международной базы данных VNTRPLUS, показал, что исследуемый штамм кластеризуется с лекарственно-устойчивыми штаммами, выделенными на территории бывшего СССР, входящими в сполигосемейство Beijing, однако в базе данных VNTRPLUS отсутствуют штаммы с полностью идентичными MIRU-VNTR профилями (рис. 8). Сравнение

Таблица. Результаты MIRU-VNTR-типирования

№ ДНК	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40	QUB-11a	QUB-11b	QUB 26	ETR-A	ETR-B	ETR-C	ETR-F	VNTR 0424	VNTR 0569	VNTR 0595	VNTR 1443	VNTR 1895	VNTR 1955	VNTR 1982	VNTR 2347	VNTR 2401	VNTR 3171	VNTR 3232	VNTR 3336	VNTR 3690	VNTR 4120	VNTR 4156
1	2	2	3	3	2	5	1	5	3	5	3	3	9	6	8	4	2	4	2,7	2,6	н/д	1	7	2	5	8	4	4	2	14	7	3,6	9	2

Distance	ID	Species	Lineage	MLVA MtbC15-9	154 MIRU02	424 Mtb04	577 ETRC	590 ETRB	802 MIRU40	960 MIRU10	1544 MIRU16	1955 Mtb21	2059 MIRU20	2163b QUB11b	2165 ETRA	2247 Mtb29	2401 Mtb30	2462 Mtb34	2531 ETRB	2687 MIRU23	2996 MIRU24	3007 MIRU26	3171 MIRU27	3192 Mtb34	3690 MIRU31	4057 Mtb39	4156 QUB26	4248 QUB4156	4248 MIRU39
User Type 1					9358-25	2	2	4	2	3	3	3	5	2	6	4	4	4	2	5	1	5	3	2	5	3	8	2	3
0.0833	3256/02	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	94-32	2	4	4	2	3	3	3	5	2	6	4	4	4	2	5	1	5	3	3	5	3	8	2	3	
0.0833	3277/02	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	94-32	2	4	4	2	3	3	3	5	2	6	4	4	4	2	5	1	5	3	3	5	3	8	2	3	
0.0833	3364/02	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	94-32	2	4	4	2	3	3	3	5	2	6	4	4	4	2	5	1	5	3	3	5	3	8	2	3	
0.125	3309/02	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	94-33	2	4	4	2	3	3	3	5	2	6	4	4	4	2	5	1	5	3	3	5	3	8	2	4	
0.125	4498/02	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	96-32	2	4	4	2	3	3	3	6	2	6	4	4	4	2	5	1	5	3	3	5	3	8	2	3	

Рис. 8. Результаты сравнения исследуемого образца с базой данных MIRU-VNTRplus (на сайте: <http://www.miru-vntrplus.org>.)

с базой данных, сформированной в результате собственных исследований (34 локуса, 330 штаммов), подтвердило принадлежность изучаемого штамма к штаммам группы Beijing (рис. 9).

При проведении сравнения изучаемого штамма со штаммами, внесенными в базу данных ФБУН ГНЦ ПМБ, нами также не были обнаружены штаммы, имеющие полностью идентичные профили. Местоположение штамма на дендрограмме (рис. 10) указывает на то, что он не кластеризуется со штаммами, имеющими сполиготипы 00000000003171, 00000000003771 и 00000000003371, являясь представителем обособленной филогенетической ветви. Интересно отметить, что на основании данных, полученных при расчете гомологии на основании 24 локусов (рис. 9), подобные закономерности замечены не были.

Полученные данные свидетельствуют о том, что включение в схему идентификации гипервариабельных локусов способно не только увеличить разрешающую способность метода, но также и получить более точную филогенетическую информацию. Однако тот факт, что нам не удалось получить информацию для локуса VNTR 0569, показывает необходимость проведения дополнительных исследований.

### Сполиготипирование

На основании сполиготипирования штамм *M. tuberculosis* «Ростов» отнесен к семейству Beijing. Стоит отметить, что метод сполиготипирования обладает низкой разрешающей способностью для дифференцировки штаммов данного сполигосемейства (рис. 11).

### ПДРФ-генотипирование на основе элемента IS6110

Методом ПДРФ-IS6110 показано, что клинический штамм *M. tuberculosis* «Ростов» кластеризуется со штаммами группы Beijing, обладающими лекарственной устойчивостью. Некоторые штаммы этой группы обладают устойчивостью сразу к пяти антимикробным препаратам – стрептомицину, изониазиду, рифампицину, канамицину и этамбутолу. Следует подчеркнуть, что штаммы, использованные для сравнения, были выделены от пациентов в 2002–2003 гг. За прошедшие 10 лет могли произойти значительные изменения в структуре циркулирующих штаммов. Кроме того, данная выборка штаммов была получена только из одного региона Российской Федерации – г. Тулы и Тульской области. Штаммы, циркулирующие в других регионах, могут иметь определенные отличия.

Для эффективного мониторинга изменений в структуре популяции циркулирующих в Российской Федерации, штаммов *M. tuberculosis* необходимы работы по созданию репрезентативной коллекции клинических изолятов, полученных из всех субъектов Российской Федерации и детальному ее изучению. Такая коллекция должна иметь график стабильного пополнения клиническими образцами, что позволило бы получать данные, актуальные на момент эпидемического расследования.

### Заключение

На основании проведенных микробиологических и молекулярно-генетических исследований показано, что выделенный из мокроты больного туберкулезом человека штамм *M. tuberculosis* «Ростов» относится к семейству штам-

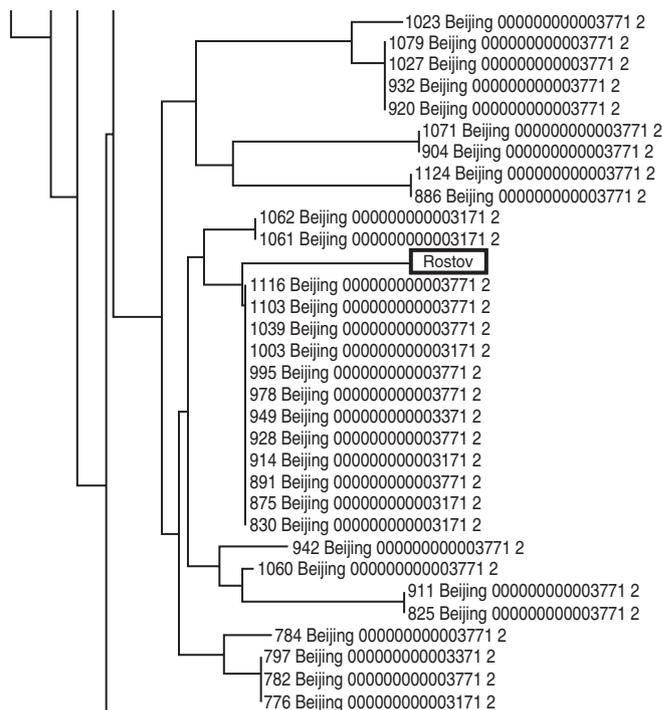


Рис. 9. Результат сравнения исследуемого образца со штаммами, выделенными в Тульской области, на основании 24 локусов MIRUVNTR.

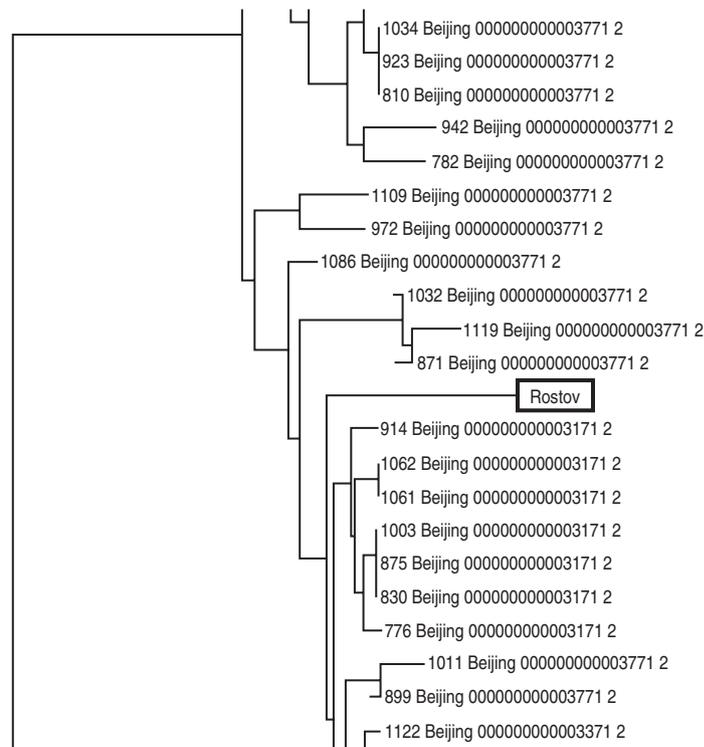


Рис. 10. Результат сравнения исследуемого образца со штаммами, выделенными в Тульской области, на основании анализа 34 локусов MIRUVNTR.

Strain #	8-digital code	Spoligo-family
№1	00000000003771	Beijing

Рис. 11. Результаты сполиготипирования штамма *M. tuberculosis* «Ростов», принадлежащего к сполигосемейству Beijing.

мов возбудителя туберкулеза Beijing (Пекин). Изученный штамм обладает широкой лекарственной устойчивостью. Экспериментально установлена более высокая вирулентность штамма *M. tuberculosis* «Ростов» для мышей линии C57BL, чем вирулентность лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, что выражается в более быстром и необратимом истощении животных; в большей степени обсемененности микобактериями органов экспериментальных животных; в более выраженной гистологической картине патологических изменений внутренних органов животных; в отсутствии защитной реакции макроорганизма в виде клеточного иммунитета на данный патоген. Важной особенностью данного штамма является его более быстрый рост на жидких питательных средах, по сравнению с лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv.

#### Финансирование

Работа выполнена за счет базового финансирования ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора.

#### Литература

1. WHO. Global Tuberculosis Report. 2016:214.ISBN 978 92 4 156539 4.
2. WHO. Available at: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_TB\\_MortalityRates\\_HIVnegative\\_2014.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_TB_MortalityRates_HIVnegative_2014.png)
3. Smirnova PA, Turkova A, Nikishova EI, Seddon JA, Chappell E, Zolotaya OA, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in children in northwest Russia: an observational cohort study. *Eur Respir J.* 2016;48(5):1496-99. DOI: 10.1183/13993003.00354-2016
4. Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol.* 2009;10(9):943-8. DOI: 10.1038/ni.1781
5. Singla N, Singla R, Fernandes S, Behera D. Post treatment sequelae of multi-drug resistant tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2009;56:206-12.
6. Ignatyeva O, Balabanova Y, Nikolayevskyy V, Koshkarova E, Radiulyte B, Davidaviciene E, et al. Resistance profile and risk factors of drug resistant tuberculosis in the Baltic countries. *Tuberculosis (Edinb).* 2015;95(5):581-8. DOI: 10.1016/j.tube.2015.05.018.
7. O'Donnell MR, Jarand J, Loveday M, Padayatchi N, Zelnick J, Werner L, et al. High incidence of hospital admissions with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis among South African health care workers. *Ann Intern Med.* 2010;153:516-522. DOI: 10.7326/0003-4819-153-8-201010190-00008.
8. Shur KV, Zaychikova MV, Mikhecheva NE, Klimina KM, Bekker OB, Zhdanova SN, et al. Draft genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* strain B9741 of Beijing B0/W lineage from HIV positive patient from Siberia. *Genom Data.* 2016;10:61-2. DOI: 10.1016/j.gdata.2016.08.001.
9. Mokrousov I. Molecular structure of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia and its interaction with neighboring countries. *Int J Mycobacteriol.* 2015;4(Suppl. 1):56-57. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2014.08.002.
10. Потапов ВД. Разработка и применение биологических моделей для изучения хронической туберкулезной инфекции. Дис. ... доктора биологических наук: 03.02.03, 03.01.06. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболенск, 2013.
11. Богун АГ, Благодатских СА, Мухина ТН, Майская НВ, Шемякин ИГ. Филогенетический анализ клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* с использованием 35 переменных тандемных повторов и шести однонуклеотидных полиморфизмов. Туберкулез и социально-значимые заболевания. 2013;(2):5-11.
12. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35(4):907-14.
13. van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(2):406-9.

#### References

1. WHO. Global Tuberculosis Report. 2016:214.ISBN 978 92 4 156539 4.
2. WHO. Available at: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_TB\\_MortalityRates\\_HIVnegative\\_2014.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_TB_MortalityRates_HIVnegative_2014.png)
3. Smirnova PA, Turkova A, Nikishova EI, Seddon JA, Chappell E, Zolotaya OA, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in children in northwest Russia: an observational cohort study. *Eur Respir J.* 2016;48(5):1496-99. DOI: 10.1183/13993003.00354-2016
4. Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol.* 2009;10(9):943-8. DOI: 10.1038/ni.1781
5. Singla N, Singla R, Fernandes S, Behera D. Post treatment sequelae of multi-drug resistant tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2009;56:206-12.
6. Ignatyeva O, Balabanova Y, Nikolayevskyy V, Koshkarova E, Radiulyte B, Davidaviciene E, et al. Resistance profile and risk factors of drug resistant tuberculosis in the Baltic countries. *Tuberculosis (Edinb).* 2015;95(5):581-8. DOI: 10.1016/j.tube.2015.05.018.
7. O'Donnell MR, Jarand J, Loveday M, Padayatchi N, Zelnick J, Werner L, et al. High incidence of hospital admissions with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis among South African health care workers. *Ann Intern Med.* 2010;153:516-522. DOI: 10.7326/0003-4819-153-8-201010190-00008.
8. Shur KV, Zaychikova MV, Mikhecheva NE, Klimina KM, Bekker OB, Zhdanova SN, et al. Draft genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* strain B9741 of Beijing B0/W lineage from HIV positive patient from Siberia. *Genom Data.* 2016;10:61-2. DOI: 10.1016/j.gdata.2016.08.001.
9. Mokrousov I. Molecular structure of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia and its interaction with neighboring countries. *Int J Mycobacteriol.* 2015;4(Suppl. 1):56-57. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2014.08.002.
10. Potapov VD. Development and application of biological models for the study of chronic TB infection. Doctoral Dissertation in Biology: 03.02.03, 03.01.06. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, 2013. (In Russian).
11. Bogun AG, Blagodatskikh SA, Mukhina TN, Maiskaya NV, Shemyakin IG. Phylogenetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using 35 variable tandem repeats and six single nucleotide polymorphisms. *Tuberculosis and socially significant diseases.* 2013;(2):5-11. (In Russian).
12. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35(4):907-14.
13. van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(2):406-9.

#### Информация об авторах:

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

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

Фурсов Михаил Васильевич, младший научный сотрудник лаборатории стрессов микроорганизмов ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН»  
Адрес: 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2  
Телефон: (495) 954-5283

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, заведующий отделом коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

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

Кисличкина Ангелина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

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

Благодатских Станислав Александрович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

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

Морозова Татьяна Павловна, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Домотенко Любовь Викторовна, кандидат химических наук, заведующая лабораторией разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Детушев Константин Владимирович, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора по качеству и развитию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

**Information about authors:**

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med), Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Tatiana I. Kombarova, Cand. Sci. (Biol.), senior researcher of Biological Testing Lab., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Mikhail V. Fursov, junior researcher of Microbial Stress Lab., Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences»  
Address: Leninsky prospect, 33, build. 2, 119071 Moscow, Russian Federation  
Phone: (495) 954-5283

Alexander G. Bogun, Cand. Sci. (Biol.), Head of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Tat'yana N. Mukhina, PhD (biol.), Senior Researcher of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Angelina A. Kislichkina, PhD (biol.), Senior Researcher of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Lidiya A. Kadnikova, postgraduate student of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Stanislav A. Blagodatsky, junior researcher of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Elena A. Ganina, Researcher of Immunochemistry for Pathogenic Microorganisms Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Tatiana P. Morozova, Researcher of the Lab. for development of nutrient media, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Lyubov V. Domotenko, Cand. Sci. (Chem.), Head of the Lab. for development of nutrient media, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Konstantin V. Detushev, Researcher of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Mikhail V. Khrarov, Cand. Sci. (Med.), Deputy Director for Quality and Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

# Дифференциация шести видов листерий с помощью ПЦР-ПДРФ анализа ITS-последовательностей, локализованных между генами 16S и 23S рРНК

Э.А.Светоч<sup>1</sup>, Е.И.Асташкин<sup>1</sup>, В.Н.Борзенков<sup>1</sup>, О.И.Тазина<sup>1</sup>,  
Н.Н.Карцев<sup>1</sup>, Н.Р.Ефимочкина<sup>2</sup>, И.П.Мицевич<sup>1</sup>, Н.К.Фурсова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБУ «НИИ питания РАН», Москва, Российская Федерация

Предлагаемый метод дифференциации шести видов бактерий рода *Listeria* основан на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS-локуса), расположенного между генами 16S и 23S рРНК. ITS-локус амплифицировали с помощью специфичных праймеров G1 и L1 и последовательно гидролизировали эндонуклеазами рестрикции BseMII, Scal и TasI. Длины рестрикционных фрагментов анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Данная схема позволила на первом этапе дифференцировать листерии патогенного для человека вида *Listeria monocytogenes*, на втором – листерии вида *Listeria innocua*, а на третьем – остальные четыре вида листерий – патогенный для животных *Listeria ivanovii* и непатогенные *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* и *Listeria grayi*.

Ключевые слова: *Listeria* spp., ПЦР-ПДРФ анализ, ITS-локус, 16S-23S рРНК

**Для цитирования:** Светоч Э.А., Асташкин Е.И., Борзенков В.Н., Тазина О.И., Карцев Н.Н., Ефимочкина Н.Р., Мицевич И.П., Фурсова Н.К. Дифференциация шести видов листерий с помощью ПЦР-ПДРФ анализа последовательностей ДНК между генами 16S и 23S рРНК. Бактериология. 2017; 2(1): 46–53. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-46-53

## Differentiation of six *Listeria* species using the PCR-RFLP analysis of DNA sequences located between 16S and 23S ribosomal RNA genes

E.A.Svetoch<sup>1</sup>, E.I.Astashkin<sup>1</sup>, V.N.Borzenkov<sup>1</sup>, O.I.Tazina<sup>1</sup>,  
N.N.Kartsev<sup>1</sup>, N.R.Efimochkina<sup>2</sup>, I.P.Mitsevich<sup>1</sup>, N.K.Fursova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation;

<sup>2</sup>Science-Research Institution of Nutrition Russian Academy of Medical Science, Moscow, Russian Federation

Method for six *Listeria* species differentiation is based on the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the internal transcribed spacer (ITS-locus) located between 16S and 23S rRNA genes has been designed. The ITS-locus was amplified using G1 and L1 specific primers (Drebot et al., 1996) and was hydrolysed by three restriction endonucleases, BseMII, Scal, and TasI. The lengths of restriction fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis. This scheme allowed differentiating the pathogenic for human *Listeria monocytogenes* on the first stage, nonpathogenic *Listeria innocua* – on the second stage and remaining four listeria species (animal pathogen *Listeria ivanovii* and nonpathogenic *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* and *Listeria grayi*) – on the third stage.

Keywords: *Listeria* spp., PCR-RFLP analysis, ITS-region of 16S-23S rRNA genes

**For citation:** Svetoch E.A., Astashkin E.I., Borzenkov V.N., Tazina O.I., Kartsev N.N., Efimochkina N.R., Mitsevich I.P., Fursova N.K. Differentiation of six *Listeria* species using the PCR-RFLP analysis of DNA sequences located between 16S and 23S ribosomal RNA genes. Bacteriology. 2017; 2(1): 46–53. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-46-53

### Для корреспонденции:

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: n-fursova@yandex.ru, fursova@obolensk.org

Статья поступила 20.12.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

### For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, PhD (Biol.), Head of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

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

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: n-fursova@yandex.ru, fursova@obolensk.org

The article was received 20.12.2016, accepted for publication 15.03.2017

**Б**актерии рода *Listeria* относятся к грамположительным факультативным анаэробам, включают в себя шесть широко распространенных видов *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, а также менее распространенные виды *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis* и *L. fleischmannii* [1–5]. Вид *L. monocytogenes* является этиологическим агентом листериоза, патогенен для человека и жвачных животных. Листериоз может протекать в инвазивной форме с поражением репродуктивной системы [6], центральной нервной системы и других органов с уровнем смертности 20–30% [7], а также в неинвазивной форме – в виде гастроэнтерита [8]. Вид *L. ivanovii*, являющийся широко известным патогеном для жвачных животных, в последние годы относят к патогенам человека – после описанного в 2010 г. случая инфекции у человека с трансплантированной почкой [9]. Кроме того, редкие случаи инфицирования человека описаны для видов листерий *L. grayi*, *L. seeligeri* и *L. innocua* [10–12]. Учитывая тот факт, что листерии достаточно широко распространены в природе и способны выживать и длительно сохраняться в пищевых продуктах [13, 14], непатогенные листерии рассматриваются как резервуар и потенциальный источник генов антибиотикорезистентности, которые могут быть переданы патогенным листериям путем горизонтального переноса [15]. Поэтому видовая идентификация представителей рода *Listeria*, выделяемых от больных людей и животных, а также из пищевых продуктов и окружающей среды, представляет большой практический и теоретический интерес.

Для идентификации и выяснения таксономического положения различных бактерий многими исследователями широко используется изучение их рибосомных рибонуклеиновых кислот (рPHK) и генов, кодирующих рPHK [16–18], в том числе – представителей рода *Listeria* [19–21]. Последовательности генов рPHK у листерий достаточно консервативны, что не позволяет использовать их для дифференциации данных видов. Менее консервативными являются последовательности межгенных регионов, в том числе – внутренний транскрибируемый спейсер (ITS-локус), расположенный между генами 16S и 23S рPHK [22–24]. Анализ нуклеотидных последовательностей ITS-локуса генов 16S и 23S рPHK *in situ* показал, что они отличаются у наиболее распространенных шести видов листерий, а также у разных серотипов *L. monocytogenes* [25].

**Цель данной работы** – разработка алгоритма идентификации видов листерий на основе анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов амплифицированных ITS-локусов, расположенных между генами 16S и 23S рPHK (ПЦР-ПДРФ); апробация алгоритма на референс-штаммах листерий и использование разработанного подхода для видовой идентификации штаммов *Listeria spp.*, выделенных из пищевых продуктов и окружающей среды в 2008–2016 гг.

## Материалы и методы

**Выделение бактериальных изолятов.** Выделение культур листерий из клинического материала, образцов пищевых продуктов и смывов из окружающей среды проводили согласно ГОСТ Р 51921-2002 «Продукты пищевые. Мето-

ды выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*» и Методическим указаниям МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах». Видовую идентификацию осуществляли на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия).

**Штаммы микроорганизмов.** В работе использованы 94 штаммов листерий из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (табл. 1): *L. monocytogenes* ( $n = 59$ ), *L. innocua* ( $n = 21$ ), *L. seeligeri* ( $n = 2$ ), *L. welshimeri* ( $n = 4$ ), *L. ivanovii* ( $n = 3$ ) и *L. grayi* ( $n = 5$ ). Хранение культур осуществляли в лиофильно высушенном виде при температуре +4°C, а также в 20%-ном глицерине при температуре –80°C. Культивирование листерий проводили на агаризованных селективно-диагностических питательных средах: PALCAM agar (HiMedia, Индия), Oxford agar (Oxoid, Великобритания), ПАЛ агар (Оболенск, Россия), мясо-пептонный агар (МПА) с 1% глюкозы (Оболенск, Россия), триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) (HiMedia, Индия), триптиказо-соевый агар (TSA) (HiMedia, Индия), мясо-пептонный бульон (МПБ) с 1% глюкозы (Оболенск, Россия), триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB) (HiMedia, Индия), триптиказо-соевый бульон (TSB) (HiMedia, Индия). Посевы инкубировали при температуре +37°C в течение 24–48 ч. Морфологию листерий изучали с помощью окраски мазков культур по Граму, определяли наличие или отсутствие у бактерий капсул и спор, их подвижность при температурах +22 и +37°C.

**Биохимические свойства** изучали по способности бактерий ферментировать углеводы (маннит, ксилозу, маннозу и рамнозу) на средах Гисса; образовывать зоны просветления при посеве на поверхность кровяного агара ( $\beta$ -гемолитическая активность); проявлять лецитиназную активность на средах с активированным углем и без угля, проявлять каталазную и нитратредуцирующую активности, а также с помощью КАМП-теста (Camp-test).

**Амплификация ДНК.** В качестве матрицы для проведения ПЦР использовали клеточные термолизаты [26]. Амплификацию ДНК проводили с помощью олигонуклеотидных праймеров G1 (5' GAAGTCGTAACAAGG 3'), специфичного к 3'-концу гена 16S рPHK, и L1 (5' CAAGGCATCCACCGT 3'), специфичного к 5'-концу гена 23S рPHK [23] в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 3 мкл 10 × Taq-буфера с  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 мкл 2,5 mM раствора каждого дНТФ, по 10 пкМ каждого праймера, 0,8 ед. Taq-полимеразы и 1 мкл клеточного лизата. Программа амплификации: начальная денатурация при 94°C в течение 2 мин; 30 циклов, состоящих из денатурации при 94°C в течение 45 с, отжига при 55°C в течение 30 с, элонгации при 72°C в течение 40 с; завершающая элонгация при 72°C в течение 10 мин.

**Рестрикция ПЦР-продуктов.** Амплифицированный образец ДНК (~1 мкг) осаждали 2,5 объемами 96%-ного этанола с добавлением 0,1 объема 3 M-ного Na-ацетата и выдерживали при температуре 20°C в течение 1 ч; центрифугировали при 16 000 g в течение 15 мин; промывали осадок 70%-ным этанолом; высушивали при 50°C в течение 10 мин и ресуспендировали в 50 мкл буфера TE. ДНК (100–150 нг) гидролизовали каждой из рестриктаз BseMII, Scal и Tsp509I («Fermentas», Литва) в 20 мкл реакционной смеси, содержа-

Таблица 1. Характеристика штаммов листерий, использованных в работе

Вид <i>Listeria</i>	Штамм	Год выделения	Источник выделения	Ферментация сахаров						Усиление гемолиза		Гидролиз лецитина	
				Маннит	Ксилоза	Манноза	Рамноза	Бета-гемолиз	КАМП-тест	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	без угля	с углем
<i>L. grayi</i>	C214	НД	НД	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	МКМ1	2010	Мясо-костная мука	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	МКМ2А	2010	Мясо-костная мука	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	МКМ2Б	2010	Мясо-костная мука	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	МКМ3	2010	Мясо-костная мука	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. innocua</i>	NCTC11288	1979	Мозг коровы	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	K644	2003	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	1	2003	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	1-36	2003	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2	2003	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	3-1	2003	Фарш	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	4-2	2003	Полуфабрикаты	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	381	2004	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	382	2004	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	СМ1	2004	НД	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	29ИП	2004	Колбаса	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	32ИП	2004	Смыв с разделочной доски	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2012-1	2012	Тушка цыпленка	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2012-9	2012	Мясной фарш	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2012-22	2012	Мясной фарш	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	2012-30	2012	Мясной фарш	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	МСЧ-164	2012	Сельдь	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	С-П 114/7	2013	Продукты	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	С-П 115/7	2013	Продукты	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
	ББ3	2016	Печень птицы	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
ББ4	2016	Печень птицы	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	
<i>L. ivanovii</i>	4912	2008	НД	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
	11840	2008	НД	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
	ATCC19119	НД	НД	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	EGD-e	1926	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	NCTC10527	1967	Дериват NCTC10225	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	GIM003	НД	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	A	НД	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	766	НД	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	NCTC10357	1926	Кролик	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	C664	НД	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	C52	НД	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	NCTC11994	1986	Мягкий сыр	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	NCTC7973	1926	Морская свинка	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4908	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4909	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4910	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4913	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	944	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	№2	2004	Говядина	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	№4	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	№6	2004	Полуфабрикаты мясные	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	M-1	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	M-2	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	M-3	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	M-5	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	M-6	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4ИП	2004	Колбаса сырокопченая	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	12ИП	2004	Колбаса сырокопченая	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	13ИП	2003	Свинина охлажденная	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	20ИП	2003	Смыв с оборудования	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	46ИП	2004	Смыв с оборудования	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
53ИП	2003	Смыв с оборудования	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
61ИП	2004	Смыв с инвентаря	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
766ИП	2004	НД	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
4486	2012	Колбаски	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
4701	2012	Тушки цыплят	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
ББ1	2015	Печень птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
ББ2	2015	Печень птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	

Таблица 1. Продолжение

Вид <i>Listeria</i>	Штамм	Год выделения	Источник выделения	Ферментация сахаров						Усиление гемолиза		Гидролиз лецитина	
				Маннит	Ксилоза	Манноза	Рамноза	Бета-гемолиз	КАМП-тест	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	без угля	с углем
<i>L. monocytogenes</i>	1	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	2	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	3	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	4	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	5	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	8	2015	Сердце КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	16	2015	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	19	2015	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	20	2015	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	17	2015	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	28	2015	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	5-1	2016	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	6-2	2016	Убойный цех птицы	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	5-2	2016	Убойный цех КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	2-2	2016	Убойный цех КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	21	2016	Убойный цех КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	12	2016	Убойный цех КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	1-2	2016	Убойный цех КРС	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	OP513/2	2016	Умерший человек	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	OP517/7	2016	Умерший человек	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
B2016/1	2016	Котлеты	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
B2016/2	2016	Котлеты	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
Тв2016/1	2016	Ликвор больного	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
Тв2016/2	2016	Ликвор больного	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	
<i>L. seeligeri</i>	NCTC11856	1983	Почва	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	SLCC5981	НД	НД	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	4911	2008	НД	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-
	10	2008	НД	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-
	47	2004	Смыв с рабочего стола	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-
	ИП	2004	Минтай замороженный	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-

щей 1 ед. эндонуклеазы рестрикции, инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Фрагменты ДНК анализировали с помощью электрофореза в 3,5%-ном агарозном геле, окрашивали раствором 0,5 мкг/мл бромистого этидия и отмывали в дистиллированной воде в течение 10 мин при активном покачивании на шейкере. Размеры рестрикционных фрагментов определяли с помощью программного обеспечения Quantity One Software на приборе Gel Doc XR System 170-8170 (Bio-RAD, США). В качестве маркера молекулярных масс фрагментов ДНК использовали «Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder» (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 и 50 п.н.) (Fermentas, Литва).

**Секвенирование последовательностей ДНК.** Секвенирование нуклеотидных последовательностей ПЦР-продуктов проводили методом Сэнгера на оборудовании ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США) в ООО «SENTOL» (Москва, Россия).

**Биоинформационный анализ** проводили с помощью компьютерных программ Vector NT19 (Invitrogen, США), CHROMAS (Technelysium, США) веб-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**Последовательности генов, размещенные в базе данных GenBank.** В базе данных GenBank размещены нуклеотидные последовательности ITS областей *L. monocytogenes* (KC179818, KC179819 и KC179820; *L. innocua* (KC179821 и

KC179822); *L. ivanovii* (KC179823); *L. welshimeri* (KC192764 и KC238306) и *L. grayi* (KC250008).

## Результаты и обсуждение

Известно, что гены, кодирующие рРНК, присутствуют в геномах бактерий в нескольких копиях, каждая из которых способна независимо накапливать мутации. Поэтому в некоторых штаммах листерий описаны несколько различающихся последовательностей ITS-локусов, расположенных между генами 16S и 23S рРНК. Так, в штамме *L. innocua* Clp11262 описаны три последовательности 16S/23S рРНК. Анализ данных, представленных в базе данных GenBank, показал, что у *L. monocytogenes* идентифицированы 8 вариантов ITS-локусов, у *L. innocua* – 7 вариантов, у *L. ivanovii* – один вариант, у *L. seeligeri* – два варианта, у *L. welshimeri* 6 вариантов; у *L. grayi* – один вариант. В ходе исследования проведен биоинформационный анализ 50 последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS-локуса), локализованного между генами 16S и 23S рРНК в геномах, размещенных в базе данных GenBank 48 штаммов: *L. monocytogenes* (n = 22), *L. innocua* (n = 7), *L. ivanovii* (n = 2), *L. seeligeri* (n = 10), *L. welshimeri* (n = 6), и *L. grayi* (n = 1) (табл. 2).

Внутривидовое разнообразие ITS-локусов у листерий незначительно по сравнению с межвидовыми различиями этих

Таблица 2. Перечень последовательностей ITS-локусов генов 16S-23S рРНК из базы данных GenBank, использованных для биоинформационного анализа

Типы ITS-локусов	Рестрикционные эндонуклеазы/Размеры фрагментов ДНК			Ссылка на базу данных GenBank
	BseMII	Scal	Tsp509I	
<i>L. monocytogenes</i> 1	199; 134	218; 115	176; 118; 39	AL591974; U44062; FR733642; FR733645; FR733644; FR733643; CP003414; FM242711; AE017262; FR720325; FR733646; FR733651; AY684791
<i>L. monocytogenes</i> 2	199; 134	218; 115	176; 118; 39	L05172; U78980
<i>L. monocytogenes</i> 3	199; 134	218; 115	180; 114; 39	CP002816
<i>L. monocytogenes</i> 4	199; 134	218; 115	180; 114; 39	FM211688
<i>L. monocytogenes</i> 5	199; 134	218; 115	180; 114; 39	CP001175
<i>L. monocytogenes</i> 6	199; 134; 18	236; 115	194; 114; 39	U44063
<i>L. monocytogenes</i> 7	201; 134	220; 115	176; 120; 39	AF514303
<i>L. monocytogenes</i> 8	200; 134	219; 115	180; 115; 39	AF514302
<i>L. innocua</i> 1	334	219; 115	177; 118; 39	U57914
<i>L. innocua</i> 2	334	219; 115	177; 118; 39	AL596164; AL596170
<i>L. innocua</i> 3	334	219; 115	177; 118; 39	AL596173
<i>L. innocua</i> 4	334	219; 115	177; 118; 39	AL596172
<i>L. innocua</i> 5	334	219; 115	177; 118; 39	U57915
<i>L. innocua</i> 6	334	219; 115	177; 118; 39	GQ919063
<i>L. innocua</i> 7	334	219; 115	177; 118; 39	GQ919062
<i>L. ivanovii</i> 1	334	334	183; 112; 39	FR687253; U57913; U78981
<i>L. seeligeri</i> 1	334	334	234; 39; 33; 28	FN557490; U57916; U78984; DQ065845; DQ065843; DQ065842; DQ065840; DQ065841; DQ065839; GQ919064
<i>L. seeligeri</i> 2	334	334	234; 39; 33; 28	DQ065844
<i>L. welshimeri</i> 1	333	333	180; 61; 53; 39	HQ389226
<i>L. welshimeri</i> 2	333	333	180; 61; 53; 39	AM263198
<i>L. welshimeri</i> 3	333	333	180; 53; 39; 33; 28	U78982
<i>L. welshimeri</i> 4	333	333	180; 61; 53; 39	GQ919065
<i>L. welshimeri</i> 5	333	333	180; 61; 53; 39	U57917
<i>L. welshimeri</i> 6	333	333	294; 39	DQ065846
<i>L. grayi</i> 1	322	322	322	U78983

локусов, что позволило нам разработать алгоритм дифференциации видов листерий на основе анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) ПЦР-продуктов, амплифицированных с помощью специфичных праймеров G1 и L1 [23]. Олигонуклеотидные праймеры G1 и L1 комплементарны последовательностям 3'-конца гена 16S рРНК и 5'-конца гена 23S рРНК, рРНК соответственно. С помощью данных праймеров происходит наработка двух ПЦР-продуктов – «малого» размером ~300 п.н. и «большого» размером ~600 п.н., что объясняется наличием генов изолейциновой тРНК или аланиновой тРНК, встроенных в некоторые копии 16S/23S рРНК ITS-локусов [25]. Объектом разработанного ПДРФ-анализа является ПЦР-продукт размером ~300 п.н., однако анализ одинаково эффективен как для «малого» фрагмента ДНК, изолированного из геля, так и в присутствии «большого» фрагмента, который не гидролизуются используемыми в анализе рестрикционными эндонуклеазами.

Первый этап алгоритма гидролиз ПЦР-продуктов эндонуклеазой рестрикции BseMII – позволяет дифференцировать листерии патогенного для человека вида *L. monocytogenes*, поскольку их ПЦР-продукты гидролизуются данной рестриктазой, а ПЦР-продукты листерий других видов – нет (табл. 2, рисунок). Второй этап алгоритма – гидролиз ПЦР-продуктов, негидролизующихся на первом этапе, эндонуклеазой рестрикции Scal. На этом этапе идентифицируются листерии вида *L. innocua*, так как только для их ПЦР-продуктов характерно наличие гидролиза. Третий этап алгоритма – обработка ПЦР-продуктов эндонуклеазой рестрикции Tsp509I, которая позволяет идентифицировать остальные четыре вида листерий – патогенный для животных

*L. ivanovii* и непатогенные *L. seeligeri*, *L. welshimeri* и *L. grayi*. При этом ПЦР-продукты *L. grayi* не гидролизуются, а ПЦР-продукты *L. ivanovii*, *L. seeligeri* и *L. welshimeri* гидролизуются с образованием фрагментов характерных размеров (табл. 1, рисунок).

Разработанный подход верифицирован на референс-штаммах и использован для идентификации 94 штаммов листерий, выделенных из пищевых продуктов в ходе исследования в 2003–2013 гг.: *L. grayi* ( $n = 5$ ), *L. innocua* ( $n = 21$ ), *L. ivanovii* ( $n = 3$ ), *L. monocytogenes* ( $n = 59$ ), *L. seeligeri* ( $n = 2$ ) и *L. welshimeri* ( $n = 4$ ). Совпадение результатов Видовая идентификация, проведенная с помощью культуральных и микробиологических методов, масс-спектрометрии и ПДРФ-ПЦР анализа полностью совпала. Важно отметить, что описанный алгоритм ПЦР-ПДРФ анализа 16S/23S рРНК ITS-локусов листерий является относительно простым и может быть использован специалистами для быстрой дифференциации патогенных и непатогенных представителей данного рода.

## Заключение

В результате проведенных исследований разработан алгоритм дифференциации шести видов листерий с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-ПЦР) внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS-локусов) генов 16S/23S рРНК, включающий в себя три последовательных этапа гидролиза ПЦР-продуктов, наработанных с помощью специфичных праймеров G1 и L1, эндонуклеазами рестрикции BseMII, Scal и TasI. Алгоритм верифицирован на контрольных штаммах и

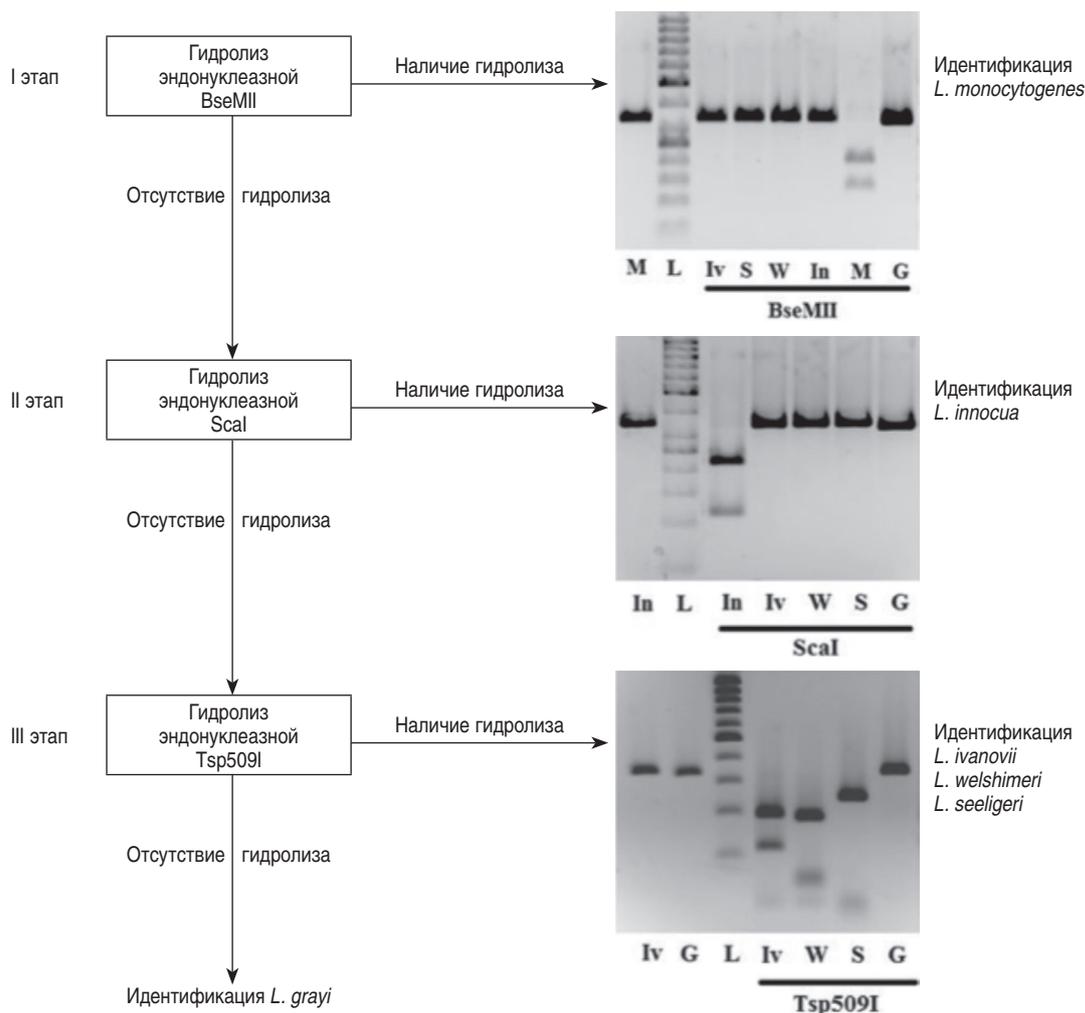


Рисунок. Алгоритм ПДРФ-ПЦР анализа внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) генов 16S-23S рибосомной РНК листерий: L – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК «Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder» (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 и 50 п.н.) (Fermentas, Литва); M – *L. monocytogenes*; In – *L. innocua*; Iv – *L. ivanovii*; S – *L. seeligeri*; W – *L. welshimeri*; G – *L. grayi*. Горизонтальной чертой отмечены образцы, гидролизованные соответствующей эндонуклеазой рестрикции.

апробирован для идентификации штаммов листерий, выделенных из пищевых продуктов в ходе исследований в 2003–2013 гг.: *L. grayi* ( $n = 5$ ), *L. innocua* ( $n = 21$ ), *L. ivanovii* ( $n = 3$ ), *L. monocytogenes* ( $n = 59$ ), *L. seeligeri* ( $n = 2$ ) и *L. welshimeri* ( $n = 4$ ); совпадение результатов ПДРФ-ПЦР-идентификации с результатами идентификации, проведенной с помощью микробиологических тестов и MALDI-TOF, составило 100%.

Работа выполнена в рамках Федеральной НИР №049 «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» и в рамках работ по Постановлению Правительства РФ №1448.

## Литература/References

- Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol.* 2006;55:645-59. DOI: 10.1099/jmm.0.46495-0
- Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, et al. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J System Evolut Microbiol.* 2010;60:1280-8. DOI: 10.1099/ijms.0.014118-0
- Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PAD, Le Flèche-Matéos A, Roche SM, et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J System Evolut Microbiol.* 2010;60:2210-14. DOI: 10.1099/ijms.0.017376-0
- Bertsch D, Rau J, Eugster MR, Haug MC, Lawson PA, Lacroix C, et al. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J System Evolut Microbiol.* 2013;63:526-32. DOI: 10.1099/ijms.0.036947-0
- Halter LE, Neuhaus K, Scherer S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J System Evolut Microbiol.* 2013;63:641-7. DOI: 10.1099/ijms.0.036830-0
- Charlier C, Goffinet F, Azria E, Leclercq A, Lecuit M. Inadequate management of pregnancy-associated listeriosis: lessons from four case reports. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(3):246-9. DOI: 10.1111/1469-0691.12281
- Rocourt J, Hogue A, Toyofuku H, Jacquet C, Schlundt J. *Listeria* and listeriosis: Risk assessment as a new tool to unravel a multifaceted problem. *Am J Infect Control.* 2001;29(4):225-7. DOI: 10.1067/mic.2001.115681
- Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis.* 2013;13:11. DOI: 10.1186/1471-2334-13-11
- Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechaï F, Mamzer-Bruneel MF, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(1):136-8. DOI: 10.3201/eid1601.091155

10. Rapose A, Lick SD, Ismail N. *Listeria grayi* bacteremia in a heart transplant recipient. *Transplant Infect Dis.* 2008;10:434-6. DOI: 10.1111/j.1399-3062.2008.00333.x
11. Rocourt J, Hof H, Schrettenbrunner A, Malinverni R, Bille J. Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweiz Med Wochenschr.* 1986;116:241-8.
12. Perrin M, Bemer M, Delamare C. Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2003;41:5308-9.
13. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* 2007;9(10):1236-43. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
14. Little CL, Sagoo SK, Gillespie IA, Grant K, McLauchlin J. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in selected retail ready-to-eat foods in the United Kingdom. *J Food Prot.* 2009;72:1869-77.
15. Katharios-Lanwermyer S, Rakic-Martinez M, Elhanafi D, Ratani S, Tiedje JM, Kathariou S. Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from nonpathogenic *Listeria* spp. to other *Listeriae*. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(21):7549-56. DOI: 10.1128/AEM.02245-12
16. Collins-Thompson DL, Slade PJ, Goethals M. Use of low molecular mass RNA profiles to identify lactic acid bacteria and related organisms associated with foods. *Int J Food Microbiol.* 1991;14:135-43.
17. Ji YE, Kempell KE, Colston MJ, Cox RA. Nucleotide sequences of the spacer-1, spacer-2 and trailer regions of the *rrn* operons and secondary structures of precursor 23S rRNAs and precursor 5S rRNAs of slow-growing mycobacteria. *Microbiology.* 1994;140(7):1763-73. DOI: 10.1099/13500872-140-7-1763
18. Kupradit C, Rodtong S, Ketudat-Cairns M. Development of a DNA microarray for simultaneous detection of multiple foodborne pathogenic bacteria in fresh chicken meat. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;29(12):2281-91. DOI: 10.1007/s11274-013-1394-1
19. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1994;32:335-51.
20. Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:945-52.
21. Xiao L, Zhang L, Wang HH. Critical issues in detecting viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time reverse transcriptase PCR. *J Food Prot.* 2012;75(3):512-7. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-346
22. Barry T, Collieran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1991;1:51-6.
23. Drebrot M, Neal S, Schlech W, Rozee K. Differentiation of *Listeria* isolates by PCR amplicon profiling and sequence analysis of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer loci. *J Appl Bacteriol.* 1996;80:174-8.
24. Gurtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol.* 1996;142:3-16. DOI: 10.1099/13500872-142-1-3
25. Graham TA, Golsteyn-Thomas EJ, Thomas JE, Gannon VP. Inter- and intraspecies comparison of the 16S-23S rRNA operon intergenic spacer regions of six *Listeria* spp. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(3):863-9. DOI: 10.1099/00207713-47-3-863
26. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, et al. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(3):647-53.
27. Böhme K, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Cañas B, Calo-Mata P. Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis.* 2011;32(21):2951-2965. DOI: 10.1002/elps.201100217
28. Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, et al. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science.* 2001;294(5543):849-852. DOI: 10.1126/science.1063447
29. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leukocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J Path Bact.* 1926;29:407-39.
30. Steinweg C, Kuenne CT, Billion A, Mraheil MA, Domann E, Ghai R, et al. Complete genome sequence of *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic member of the genus *Listeria*. *J Bacteriol.* 2010;192(5):1473-4. DOI: 10.1128/JB.01415-09

**Информация о авторах:**

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Асташкин Евгений Ильич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии и биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Борзенков Валерий Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии и биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Тазина Ольга Ивановна, лаборант-исследователь лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Карцев Николай Николаевич, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Ефимочкина Наталья Рамазановна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «НИИ питания»  
Адрес: 109240, Москва, Устьинский пр., 2/14  
Телефон: (495) 698-5346

Мицевич Ирина Петровна, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

**Information about authors:**

Edward A. Svetoch, Dr. Sci. (Vet.), professor, Chief Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Eugeny I. Astashkin, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Valery N. Borzenkov, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Olga I. Tazina, Assistant Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Nikolay N. Kartsev, Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Natalia R. Efimochkina, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher of FGBUN Scientific Research Institute of Nutrition, the Ministry of Health  
Address: 2/14, pr. Ustyinsky, Moscow, 109240, Russian Federation  
Phone: (495) 698-5346

Irina P. Mitsevich, Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

## 100 лет бактериологии

В первом номере первого тома «Journal of Bacteriology» была опубликована передовая статья В.Т.Седжвика – первого президента Общества Американских Бактериологов «Рождение новой науки – бактериологии».

*Silhavy T.J.*

*The Journal of Bacteriology Is 100.  
Journal of Bacteriology. 2016;198(1):1-3.*

## FOREWORD

### THE GENESIS OF A NEW SCIENCE,—BACTERIOLOGY

W. T. SEDGWICK, Sc.D.

*First President, Society of American Bacteriologists*

*“Die Bakteriologie ist ein Kind der jüngsten Zeit.”—FRAENKEL, 1886.*

Sciences are not made but born, and lineage often sheds light upon development. It was an acute observation of the late C. S. Peirce that some of the most fruitful of modern sciences have been bred by the crossing of older ones. Mathematical astronomy, physical chemistry, physiological psychology, astrophysics are examples, and the same thing is true of the applied sciences, as witness electrical, chemical and sanitary engineering; bio-chemistry; electro-chemistry.

## «Умная стратегия», используемая бактериями в борьбе с вирусами

Ученые из Рокфеллеровского Университета Jon McGinn и Luciano Marraffini исследовали, каким образом иммунная система микробов «организует» процесс запоминания вирусных атак.

Подобно людям, бактерии попадают под воздействие вирусов и полагаются на свою иммунную систему в защите от них. Иммунная система бактерий, известная как CRISPR, помогает микробам «запоминать» вирусы, обеспечивая противодействие вирусам в будущем. CRISPR была открыта в середине нулевых, и именно тогда ученые заметили нечто необычное: иммунная система последовательно записывает вирусные атаки, помещая последнюю атаку вируса на первое место в череде генетически кодируемых событий.

Исследователи из Рокфеллеровского Университета нашли объяснение, почему микробы хранят свои иммунологические «записи» именно таким образом. Микробные системы CRISPR запоминают вирусы, захватывая генетические фрагменты вирусов и храня их подобно бусинам на нитке (система CRISPR постоянно образует кластеры, перемежающиеся полиндромными повторами). При повторной встрече клетки именно с этим вирусом, CRISPR-ассоциированные ферменты (Cas) используют эти фрагменты (спейсеры) для узнавания и расщепления этого вируса. Благодаря такой точности, одна из таких систем, CRISPR-Cas9, стала мощным инструментом редактирования геномов.

Установлено, что небольшая часть бактериального генома, «лидерная последовательность», отвечает за переадресацию самого позднего вирусного фрагмента на первую позицию в системе CRISPR. При изменении этой последовательности система CRISPR прекращает добавлять новые спейсеры во фронтальной части и в дальнейшем начинает вставлять их по направлению вниз. Бактерии, у которых спейсеры установлены неправильно, еще в состоянии защитить себя при небольшой концентрации фагов, но чувствительны к высокой концентрации фага.

Полученные результаты могут послужить толчком к разработке биотехнологии нового типа на основе CRISPR, которую пока еще можно отнести к области фантастики.

*McGinn J., Marraffini L.A.*

*CRISPR-Cas Systems Optimize Their Immune Response by Specifying the Site of Spacer Integration.  
Mol Cell. 2016 Nov 3;64(3):616-623. doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.038*

# Определение специфической активности питательных сред для *Pseudomonas aeruginosa*

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

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

Остро стоящий вопрос экологической ситуации, современные разработки новых поколений антисептиков, широкое применение антибиотиков в медицине, в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, небрежное использование антибактериальной терапии – все это ведет к модификации бактерий и появлению у них новых факторов патогенности. Среди многообразия микромира выделенная и описанная более ста лет назад синегнойная палочка является серьезной проблемой в различных областях жизни и по настоящее время.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, питательные среды

**Для цитирования:** Шепелин А.П., Сергеева А.Б., Полосенко О.В. Определение специфической активности питательных сред для *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2017; 2(1): 54–60. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-54-60

## Determination of nutrient medium specific activity for *Pseudomonas aeruginosa*

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

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

Acute ecological problems; modern development of new generations of antiseptics; widespread usage of antibiotics in medicine, food industry, agriculture; carelessness usage of antibacterial therapy, all this causes bacteria modifications and their new pathogenicity feature.

Among the variety of the microcosm isolated and described over one hundred years ago *Pseudomonas aeruginosa* infection is currently a serious problem in various fields of life.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, culture medium

**For citation:** Shepelin A.P., Sergeeva A.B., Polosenko O.V. Determination of nutrient medium specific activity for *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriology. 2017; 2(1): 54–60. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-54-60

Семейство *Pseudomonadaceae*, к которому относится *P. aeruginosa*, включает свободноживущие грамотрицательные неферментирующие бактерии, которые обитают преимущественно в почве и воде и имеют ограниченное клиническое значение в патологии человека. В отличие от большинства представителей данного рода, синегнойная палочка является основным возбудителем псевдомонадных инфекций у человека и входит в состав его нормальной микрофлоры [1].

Характерной биологической особенностью синегнойной палочки является ее способность вырабатывать пигменты.

Различают культуры, продуцирующие синий пигмент пиоцианин и желто-зеленый флуоресцеин. Некоторые штаммы, кроме того, выделяют другие пигменты: желтый (гемопиоцианин), красный (пиорубин) и черный (меланин). Культуры также имеют специфический запах, напоминающий запах цветущей липы. Синегнойная палочка обладает сравнительно слабой сахаролитической активностью. Имеет достаточно выраженные протеолитические свойства. Она легко приспосабливается к большинству антибиотиков, устойчива даже к очень высоким их концентрациям. Патогенна для человека [2].

### Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: +7 (4967) 31-2157  
E-mail: shepelin@obolensk.org

Статья поступила 25.11.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

### For correspondence:

Anatoly P. Shepelin, Sc.D., Deputy director of research and production, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 142279 Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, Russia  
Phone: +7 (4967) 31-2157  
E-mail: shepelin@obolensk.org

The article was received 25.11.2016, accepted for publication 15.03.2017

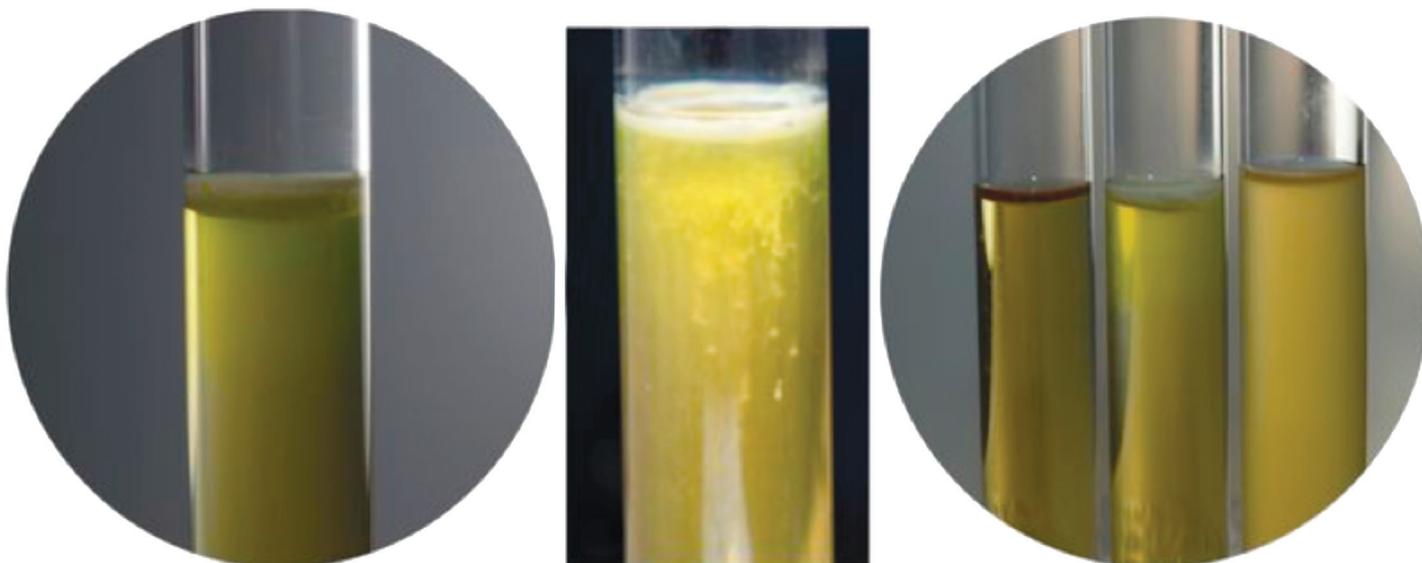


Рис. 1. *Pseudomonas aeruginosa* на питательной среде №8 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Излюбленным местом обитания синегнойной палочки являются бассейны, где в межплиточном пространстве они создают целые колонии. Способность к образованию биопленок (колония синегнойных палочек формирует сплошной пласт, покрытый биополимером, который способен надежно защитить их от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды) и способность сохраняться в воде до 1 года при температуре 37°C создают целый спектр проблем в этой области.

Целый ряд особенностей позволяет синегнойной палочке также лидировать по частоте возникновения и внутрибольничных инфекций.

Основная опасность кроется в факторах патогенности синегнойной палочки:

- подвижность за счет жгутиков;
- способность выработки токсинов (эндотоксин, экзотоксин, эндогемолизин, фермент лейкоцидин), которые вызывают поражение эритроцитов, клеток печени, запуск интоксикации, гибель лейкоцитов в очагах;
- высокая устойчивость к ряду антибактериальных средств за счет способности образовывать вокруг своих колоний слизеподобную капсулу – гликокаликс (в частности, устойчива к бета-лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам), что затрудняет эффективность лечебных мероприятий у таких больных [3];
- способность к неспецифической адгезии – бактерия обладает свойством прикрепляться к небиологическим объектам: катетерам, трубкам аппарата искусственной вентиляции легких, эндоскопам, хирургическим инструментам [4].

Все эти факторы создают необходимость лабораторного контроля больничных учреждений, а также контроля в области производства продуктов питания, лекарственных препаратов, косметической продукции и др. объектов в санитарной и клинической микробиологии.

Синегнойная инфекция характеризуется отсутствием клинически специфических симптомов, что значительно затрудняет постановку предварительного диагноза, и окончательный диагноз выставляется только после лабораторного

обследования. Корректная идентификация *P. aeruginosa* и родственных микроорганизмов обусловлена, в первую очередь, различиями в их природной чувствительности (устойчивости) к антибиотикам [5]. Ведущим методом диагностики является бактериологический с последующей бактериоскопией.

Метод выявления бактерий вида *P. aeruginosa* при лабораторной диагностике на первом этапе включает предварительное обогащение в неселективной среде. Для этой цели используются различные питательные бульоны.

ФБУН ГНЦ ПМБ выпускает различные питательные среды для накопления и идентификации псевдомонад. Так, питательная среда №8 ГРМ предназначена для выращивания синегнойной палочки и стафилококков при контроле микробной загрязненности нестерильных лекарственных



Рис. 2. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на ГРМ-араге (ФБУН ГНЦ ПМБ).

средств и других объектов, а также при проведении исследований в санитарной и клинической микробиологии.

Характерной особенностью бактерий *P. aeruginosa* является образование слизи. В связи с этим на жидких средах образуется особая серовато-серебристая пленка. При старении культур происходит образование мути с последующим выпадением слизистого осадка (рис. 1).

В качестве питательной среды для культивирования различных неприхотливых микроорганизмов, в том числе и синегнойной палочки, используется ГРМ-агар. Рост тест-штамма *P. aeruginosa* 27/99 на ГРМ агаре сопровождается образованием сине-зеленого пигмента через 18–20 ч инкубации при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  (рис. 2).

Большинство штаммов синегнойной палочки производит пигмент пиоцианин, имеющий сине-зеленый цвет. Для вы-

явления пигмента пиоцианина у синегнойной палочки при контроле микробной загрязненности нестерильных лекарственных средств, а также при проведении исследований в санитарной и клинической микробиологии используют среду № 9-ГРМ [6] (рис. 3).

На плотных питательных средах она диссоциирует на R-, S-, и M-формы, которые продуцируют характерные пигменты: пиоцианин (феназиновый пигмент сине-зеленого цвета), пиовердин (желто-зеленый флюоресцирующий в ультрафиолетовых лучах) и пиорубин (бурого цвета).

Рост псевдомонад на питательных средах ФБУН ГНЦ ПМБ вызывает интерес своим разнообразием.

1. На среде Плоскирева – ГРМ рост *P. aeruginosa* 453 наблюдается в виде мелких жемчужного цвета колоний, а на среде с эозин-метиленовым синим (среда Левина)



Рис. 3. *P. aeruginosa* на среде №9 производства ФБУН ГНЦ ПМБ.



Рис. 4. Рост *P. aeruginosa* 453 на агаре Плоскирева-ГРМ ФБУН ГНЦ ПМБ.



Рис. 5. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на среде Левина-ГРМ ФБУН ГНЦ ПМБ.



Рис. 6. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на агаре Эндо-ГРМ ФБУН ГНЦ ПМБ.



Рис. 7. Рост *P. aeruginosa* 453 на Хромагаре ФБУН ГНЦ ПМБ.

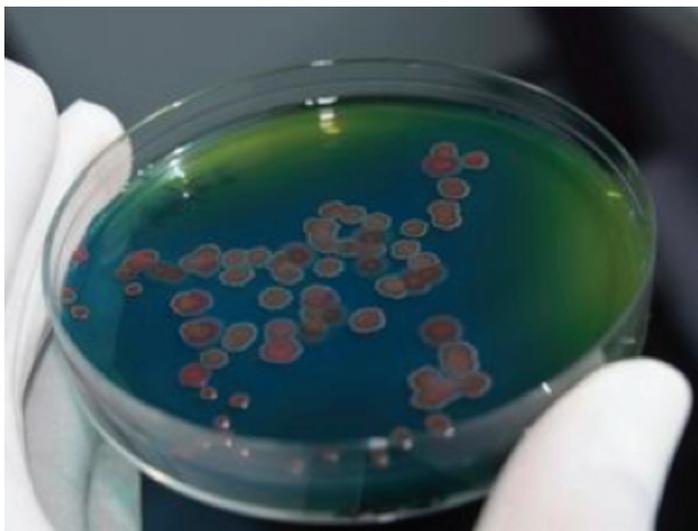


Рис. 8. Рост *P. aeruginosa* 27/99 и *P. aeruginosa* ATCC 9027 на лактозном ТТХ агаре с тергитолом 7 ФБУН ГНЦ ПМБ.

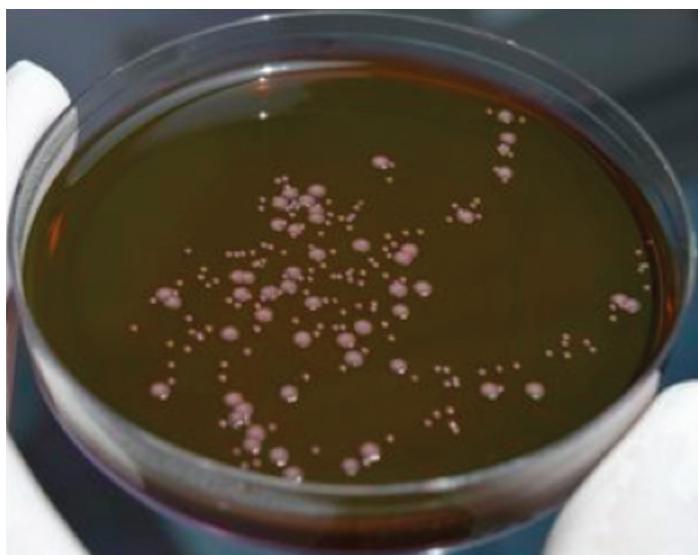
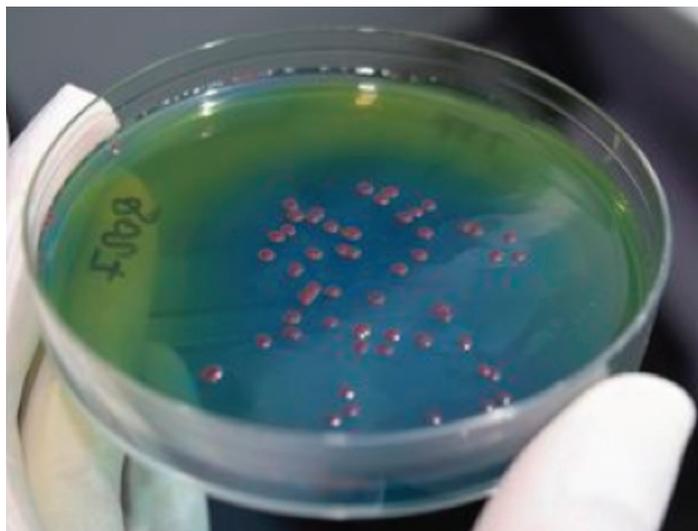


Рис. 9. Рост *P. aeruginosa* 453 на кровяном агаре и среде Левина-ГРМ.

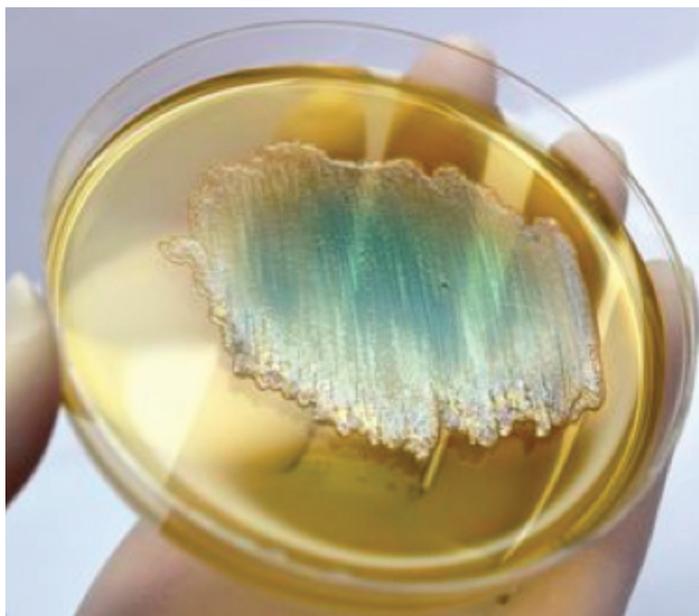


Рис. 10. Феномен радужного лизиса *P. aeruginosa*.

*P. aeruginosa* 27/99 образует крупные розового цвета колонии (рис. 4, 5).

2. На среде Эндо тест-штамм *P. aeruginosa* 27/99 и на Хромагаре тест-штамм *P. aeruginosa* 453 соответственно образуют бесцветные непрозрачные в R- и S-форме колонии (рис. 6, 7).

3. На лактозном ТТХ агаре с тергитолом 7 тест-штамм *P. aeruginosa* 27/99 образует крупные красно-коричневого цвета с неровным краем и с синей зоной колонии, а тест-штамм *P. aeruginosa* ATCC 9027 растет в виде мелких круглых, красно-коричневого цвета с синей зоной колоний (рис. 8).

Диссоциация бактериальных клеток *P. aeruginosa*, возникающая спонтанно и характеризующаяся образованием отличающихся друг от друга колоний, наблюдается на различных плотных дифференциально-диагностических средах. Так, *P. aeruginosa* 453 на плотных средах формирует типы колоний R, S и M-формы (рис. 9).

На плотных средах у синегнойной палочки может наблюдаться феномен радужного лизиса – появление на поверх-

ности колоний пленки, переливающейся всеми цветами радуги в отраженном свете (рис. 10) [7].

В бактериологической практике выделение типичных колоний и подтверждение их принадлежности к бактериям вида *P. aeruginosa* на агаризованной селективно-диагностической питательной среде проводят после предварительного обогащения исследуемого материала в неселективной среде с последующим подтверждением по отношению к окраске по Граму, образованию пигментов, наличию специфического запаха и по биохимическим признакам [8]. Это прежде всего положительный цитохромоксидазный тест, способность окислять глюкозу на среде Хью-Лейфсона в аэробных условиях, тест на подвижность, редукция нитратов, а также выявление термофильности (рост при 42°C и его отсутствие при 5°C).

В качестве селективных питательных сред чаще используют среды с ингибиторами: цетримидом и триклозаном.

Во ФБУН ГНЦ ПМБ разработана Селективная питательная среда с цетримидом (Цетримидный агар) для выделения *P. aeruginosa* из клинического материала, объектов внешней среды, пищевых продуктов и др. [9]. Питательная среда обеспечивает рост *P. aeruginosa* с соответствующим пигментом. Рост сопутствующих грамположительных и грамотрицательных бактерий в значительной степени ингибируется.

Ведущими зарубежными фирмами выпускаются питательные среды с цетримидом на основе желатина, мясного пептона и лактозы, а также содержащие калий серноокислый, магний хлористый, цетримид, агар, налидиксовую кислоту и глицерин. В цетримидном агаре в качестве белковой основы используется панкреатический гидролизат казеина, выпускаемый в НПО ПС, а дополнительно внесенный дрожжевой экстракт в состав питательной среды, содержащий витамины группы В, стимулирует оптимальные условия роста псевдомонад.

При разработке цетримидного агара магний хлористый заменен на магний серноокислый, что в присутствии фосфатов калия приводит к усилению образования пигмента (рис. 11). Кроме того, замена калия серноокислого на одно- и двухзамещенные фосфаты калия улучшает дифференцирующие свойства за счет поддержания буферной емкости среды.



Рис. 11. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на селективной питательной среде для выделения псевдомонад (Цетримидный агар) ФБУН ГНЦ ПМБ.



Рис. 12. Слева направо: рост тест-штамма *P. aeruginosa* 453 на питательной среде для контроля микробной загрязненности (Питательная среда № 13 ГРМ) ФБУН ГНЦ ПМБ, контроль (незаeseянная пробирка).

Для усиления ингибирующего эффекта в отношении сопутствующей микрофлоры в состав питательной среды дополнительно внесена налидиксовая кислота.

Ввиду того, что синегнойная палочка является значимым патогеном для человека и способна занимать различные экологические ниши, при разработке питательных сред для выделения и идентификации микроорганизмов, *P. aeruginosa* используется как один из важных контрольных тест-штаммов.

Синегнойная палочка обладает низкой сахаролитической активностью, она не ферментирует глюкозу и другие углеводы, но способна их окислять для получения энергии.

Тест-штамм *P. aeruginosa* 453 не ферментирует углеводы, не выделяет сероводород, поэтому на трехсахарном агаре с солями железа – питательной среде для выявления сероводорода и определения ферментации лактозы, глюкозы, сахарозы (питательная среда №13 ГРМ), рост сопровождается образованием пигмента в виде серого налета на поверхности скошенной части среды без изменения цвета среды (рис. 12).

Лечение синегнойной инфекции проводится антибактериальными препаратами после определения чувствительности к ним возбудителя.

С целью определения терапевтической схемы лечения инфекционных болезней и характеристики штаммов используется агар Мюллера-Хинтона или питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (рис. 13).

Диаметры зон задержки роста вокруг дисков с антибактериальными препаратами удовлетворяют требованиям клинических рекомендаций по определению чувствительности микроорганизмов к antimicrobным препаратам 2014 г и EUCAST.

Таким образом, ФБУН ГНЦ ПМБ производит полный набор питательных сред для выявления бактерий *P. aeruginosa* методом бактериологического исследования, изучения культуральных и морфологических признаков, а также пигментообразования и определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Использование вышеуказанных питательных сред позволяет решить задачу не только успешного выявления синегнойной инфекции, но и своевременного и эффективного назначения антибактериальной терапии.

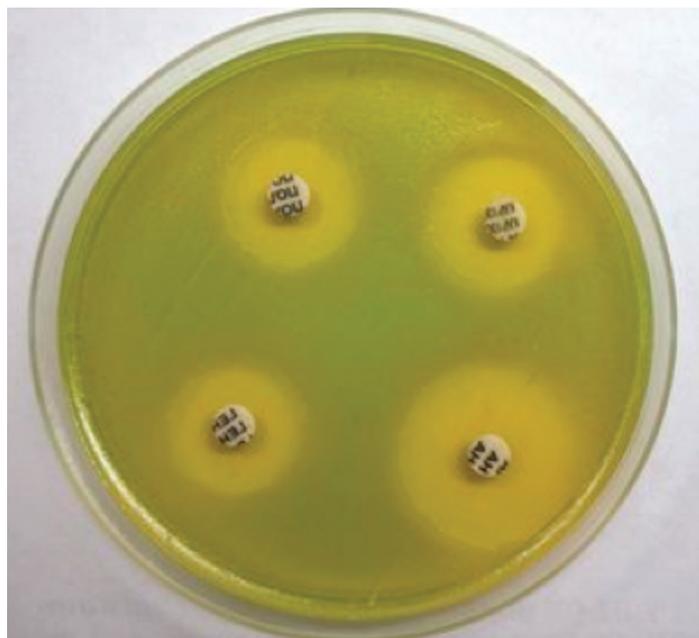


Рис. 13. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом, слева направо: Агар Мюллер-Хинтон, питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам производства ФБУН ГНЦ ПМБ.

## Литература

1. Илюкевич ГВ. Синегнойная инфекция: в новый век со старой проблемой. Медицинские новости. 2004;12:3-8.
2. МР Методические рекомендации по бактериологической диагностике синегнойной инфекции. М., 1984, с. 5.
3. Быкова НИ. Синегнойная палочка (синегнойная инфекция). [Электронный ресурс]. Доступно по: <http://www.medicalj.ru>
4. Синегнойная палочка: как передается, чем опасна, клиника. [Электронный ресурс]. Доступно по: <http://uhonos.ru/infekcii/vnutribolnichnaya>
5. Сидоренко СВ, Резван СП, Стерхова ГА, Грудинина СА. Госпитальные инфекции, вызванные *Pseudomonas aeruginosa*. Распространение и клиническое значение антибиотикорезистентности. Антибиотики и химиотерапия. 1999; 3:25-34.
6. МУК 4.2.2942-11. Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях.
7. Псевдомонады. Род *Pseudomonas*. Синегнойная палочка. Эпидемиология синегнойной палочки. Распространенность синегнойной палочки. [Электронный ресурс]. Доступно по: <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/MedUniver>
8. ГОСТ Р 54755-2011. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*
9. Патент: RU 2530549 Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ). Храмов Михаил Владимирович, Шепелин Анатолий Прокопьевич, Полосенко Ольга Вадимовна, Марчихина Ирина Ивановна, Шолохова Любовь Петровна, Мартовецкий Михаил Николаевич.

## References

1. Ilyukevich GV. Sinegnoinaya infektsiya: v novyi vek so staroi problemoi. Meditsinskie novosti. 2004;12:3-8. (In Russian).
2. Methodical recommendations on the bacteriological diagnosis of *Pseudomonas* infection. Moscow, 1984, p. 5. (In Russian).
3. Bykova NI. Sinegnoinaya palochka (sinegnoinaya infektsiya). [Internet]. Available at: <http://www.medicalj.ru> (In Russian).
4. Sinegnoinaya palochka: kak peredaetsya, chem opasna, klinika. [Internet]. Available at: <http://uhonos.ru/infekcii/vnutribolnichnaya> (In Russian).

5. Sidorenko SV, Rezvan SP, Sterkhova GA, Grudina SA. Gospital'nye infektsii, vyzvannye *Pseudomonas aeruginosa*. Rasprostraneniye i klinicheskoye znachenie antibiotikorezistentnosti. Antibiotics and Chemotherapy. 1999;3:25-34. (In Russian).
6. МУК 4.2.2942-11. Metody sanitarno-bakteriologicheskikh issledovaniy ob'ektov okruzhayushchei sredy, vozdukh i kontrolya steril'nosti v lechebnykh organizatsiyakh [Methods of sanitary-bacteriological researches of objects of environment, air quality and sterility control in health organizations]. (In Russian).
7. Pseudomonady. Rod *Pseudomonas*. Sinegnoinaya palochka. Epidemiologiya sinegnoinoi palochki. Rasprostranennost' sinegnoinoi palochki. [Internet]. Available at: <http://meduniver.com/Medical/Microbiology/MedUniver> (In Russian).
8. ГОСТ Р 54755-2011. Produkty pishchevye. Metody vyyavleniya i opredeleniya kolichestva bakterii vida *Pseudomonas aeruginosa* [Food. Methods of detecting and quantifying bacteria of the species *Pseudomonas aeruginosa*] (In Russian).
9. Patent: RU 2530549 Federal budget institution of science State research center for applied Microbiology and biotechnology (FBSI SSC MBP). Khramov MV, Shepelin AP, Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Martovetskii MN.

### Информация о авторах:

Сергеева Анна Борисовна, инженер-микробиолог  
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: +7 (4967) 36-0017  
E-mail: Shadowwrite@mail.ru

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, заведующая сектором микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279 Россия, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: +7 (4967) 36-0017  
E-mail: polosenko@obolensk.org

### Information about authors:

Anna B. Sergeeva, engineer-microbiologist, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: 142279 Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, Russia  
Phone: +7 (4967) 36-0017  
E-mail: Shadowwrite@mail.ru

Olga V. Polosenko. Ph.D., Chief of Microbiological Research Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: 142279 Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, Russia  
Phone: +7 (4967) 36-0017  
E-mail: polosenko@obolensk.org

## НОВОСТИ НАУКИ

### Появление микроба, похожего на возбудитель сибирской язвы

Новая родственная *Bacillus anthracis* бактерия была открыта исследователями из Института Роберта Коха в Германии. Она, по-видимому, имитирует симптомы сибирской язвы у различных млекопитающих в Африке. Этот новый патоген генетически более похож на *Bacillus cereus*, другую родственную бактерию, которая может вызвать пищевое отравление, но содержит две секции генетического материала, который наблюдали только для случаев *B. anthracis*. Это дополнение описывает поведение нового вида как более близкого к поведению микробов, вызывающих сибирскую язву, несмотря на их эволюционирование от штаммов *B. cereus*. Эти результаты показывают, что для понимания влияния этого нового микроба на здоровье животных и человека необходим надзор за новой инфекцией.

Antonation K.S., Grützmacher K., Dupke S., Mabon P., Zimmermann F., Lankester F., et al.  
*Bacillus cereus* Biovar *Anthraxis* Causing Anthrax in Sub-Saharan Africa – Chromosomal Monophyly and Broad Geographic Distribution.  
*PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016; 10(9): e0004923. doi:10.1371/journal.pntd.0004923

# Антимикробная активность ниосомального геля с доксорубицином в комплексном лечении меланомы челюстно-лицевой области

И.А.Базиков, А.Н.Мальцев, В.А.Зеленский, В.И.Королькова, Н.И.Калинкина, Е.А.Гоптарева

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

Изучена антимикробная активность ниосомального геля с доксорубицином. Исследованы микроорганизмы с поверхности кожи контрольной группы и кожи больных базалиомой. Определяли чувствительность выделенной микрофлоры к доксорубицину, серебряным ниосомам и ниосомальному гелю с доксорубицином. Исследование было направлено на выделение и идентификацию потенциальных патогенов (*S. aureus*, *S. albus*, *M. lysodeicticus*). Установлено, что опытный образец разработанного геля обладал высокой антимикробной активностью ко всем видам изученных микроорганизмов, причем антимикробная активность серебра усиливала действие препарата.

**Ключевые слова:** доксорубицин, ниосомы, антимикробная активность

**Для цитирования:** Базиков И.А., Мальцев А.Н., Зеленский В.А., Королькова В.И., Калинкина Н.И., Гоптарева Е.А. Антимикробная активность ниосомального геля с доксорубицином в комплексном лечении меланомы челюстно-лицевой области. Бактериология. 2017; 2(1): 61–65. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-61-65

## Antimicrobial activity of niosomal gel with doxorubicin in complex treatment of melanoma

I.A.Bazikov, A.N.Maltsev, V.A.Zelensky, V.I.Korol'kova, N.I.Kalinkina, E.A.Goptareva

Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Antimicrobial activity of niosomal gel with doxorubicin have been studied. Microorganisms from the skin surface of control group and of patients with basalioma have been studied. Sensitivity of selected microflora for doxorubicin, niosomes with silver and niosomal gel with doxorubicin has been investigated. The study was aimed to select and identify of potential pathogens (*S. aureus*, *S. albus*, *M. lysodeicticus*). It was established that the prototype of the developed gel had high antimicrobial activity to all types of microorganisms studied, and the antimicrobial activity of silver enhanced the effect of the preparation.

**Keywords:** doxorubicin, niosomes, antimicrobial activity

**For citation:** Bazikov I.A., Maltsev A.N., Zelensky V.A., Korol'kova V.I., Kalinkina N.I., Goptareva E.A. Antimicrobial activity of niosomal gel with doxorubicin in complex treatment of melanoma. Bacteriology. 2017; 2(1): 61–65. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-61-65

**П**ротивоопухолевая терапия обладает иммуносупрессивным действием. В связи с этим, существенной проблемой в терапии злокачественных новообразований продолжает оставаться развитие инфекционных осложнений. По данным РОНЦ им. Н.Н.Блохина (2001 г.), эти осложнения являются причиной летальных исходов у 1/3 онкологических больных. Инфекции представляют одну из существенных проблем в ведении онкологических больных, связанную с целым рядом способствующих этому факторов [1–5].

Экспериментально доказано наличие антимикробной активности у антрациклинов, что является косвенным свиде-

тельством того, что данные препараты хорошо проникают не только через цитоплазматическую мембрану эукариот, но и через клеточную стенку бактерий [6]. Об их антимикробной активности свидетельствуют также данные некоторых авторов о развитии диарей и колитов, обусловленных *Clostridium difficile*, при применении ряда противоопухолевых препаратов, в том числе и доксорубицина [7–9].

Для оптимизации фармакологических параметров, включающих пролонгированность и снижение токсичности, ранее нами была разработана ниосомальная форма доксорубицина [10–12]. В связи с этим целью работы явилось изучение

### Для корреспонденции:

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

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310

Телефон: (8652) 35-2475

E-mail: bazikov@list.ru

Статья поступила 16.01.2017 г., принята к печати 15.03.2017 г.

### For correspondence:

Igor' A. Bazikov, Sc.D., Professor, head of Department of Microbiology, Stavropol State Medical University

Address: 310 Mira Str., Stavropol', 355017, Russian Federation

Phone: (8652) 35-2475

E-mail: bazikov@list.ru

The article was received 16.01.2017, accepted for publication 15.03.2017

антимикробной активности модифицированного атомами серебра ниосомального геля с доксорубицином.

### Материалы и методы

Работа выполнялась в течение 2013–2016 гг. на кафедре микробиологии, в лаборатории нанотехнологий лекарственных веществ и кафедре онкологии с курсом ПДО Ставропольского государственного медицинского университета.

Было проведено качественное и количественное исследование микрофлоры кожи, ее бактерицидной активности (БАК) и кислотности у 30 больных базалиомой в возрасте 36–59 лет, проходящих курс химиотерапии. Исследования проводили до начала курса химиотерапии, после первого и второго курсов. В качестве контрольной группы выступали 25 здоровых добровольцев того же возраста.

Бактериологические исследования заключались в выделении микроорганизмов с поверхности кожи контрольной группы и кожи больных базалиомой до лечения и в процессе лечения. Определяли чувствительность выделенной микрофлоры к доксорубину, серебряным ниосомам и ниосомальному гелю с доксорубицином. Исследование было направлено на выделение и идентификацию потенциальных патогенов (*S. aureus*, *S. albus*, *M. lysodeicticus*). Методика постановки и интерпретация полученных результатов определения чувствительности выделенной микрофлоры производились при помощи диско-диффузионного метода согласно стандартам Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS 2000).

При конструировании антимикробного ниосомального геля отработывалась технология получения ниосом и инкапсулирование доксорубина. Оболочка полученных ниосом создавалась из ПЭГ-12 диметикона по оригинальной технологии [13].

Для серебрения ниосом использовали 1 мМ раствор  $\text{AgNO}_3$ . Серебро восстанавливали в реакции  $\text{Cu} + 2\text{AgNO}_3 \rightarrow 2\text{Ag} + \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  в химически чистой медной посуде. Таким образом, из реакционной смеси удалялись нитраты и обеспечивалось осаждение на ниосомы чистого серебра. Сорбция серебра в ниосомы проходила при ультразвуковой обработке реакционной смеси. Режим озвучивания: частота – 20 кГц, мощность – 200 Вт, экспозиция – 10–15 минут.

Исследование антимикробной активности доксорубина, посеребренных ниосом и ниосомального геля с доксорубицином в отношении микроорганизмов, выделенных с поверхности кожи здоровых и больных базалиомой пациентов, осуществляли диско-диффузионным методом (ДДМ). Бумажные диски пропитывали доксорубицином, посеребренными ниосомами и ниосомальным гелем с доксорубицином. Затем их накладывали на газоны микроорганизмов, выделенных с поверхности кожи, в 3 чашки Петри с питательным агаром. Засеянные чашки оставляли при комнатной температуре на 1–2 ч, а затем на 16–18 ч помещали в термостат при  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  вверх дном, чтобы избежать попадания конденсационной воды на поверхность посевов. Исследуемые антимикробные препараты диффундировали в агар, формируя вокруг диска зону угнетения роста чувствительных к нему бактерий, четко выделяющуюся на фоне сплошного микробного роста. Величина зоны лизиса определяла степень чувстви-

тельности микроба к препарату. Измерение лизиса производили с помощью миллиметровой бумаги с точностью до 0,1 мм. Степень чувствительности микроба к препарату ранжировали в зависимости от размера зоны угнетения роста: менее 10 мм – слабая чувствительность; 10 мм – умеренная чувствительность; более 10 мм – высокая чувствительность. Полученные данные обрабатывались общепринятыми статистическими методами: рассчитывали значения средней арифметической ( $\bar{X}$ ) и стандартного отклонения среднего ( $S_x$ ). При оценке достоверности различий между сравниваемыми величинами применялся непараметрический критерий Манна-Уитни. Уровень достоверности различий принимался при  $P \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

По данным электронной и атомно-силовой микроскопии размер частиц ниосом с доксорубицином был преимущественно 100–140 нм и с незначительным присутствием ниосом меньших размеров – 80–100 нм (рис. 1).

Результаты анализа размерных характеристик серебряных ниосом с доксорубицином показали, что обработка серебром приводила к уменьшению размеров ниосом. Большинство ниосом имели размер до 110–120 нм (рис. 2), что улучшало трансдермальный перенос лекарственных средств. Кремнийорганические ниосомы являлись эффективным сорбентом атомов серебра. Так, в нейтральной среде ( $\text{pH} = 7$ ) около 80% участвовавшего в реакции восстановленного серебра переходило в ниосомы. Количество серебра в ниосомах составило  $0,864 \pm 0,054$  мг/л. Высокая сорбционная способность кремнийорганических ниосом объяснялась наличием функционально активных групп Si-O-Si молекулы диметикона в гидрофильной части оболочки ниосом. Наличие на поверхности ниосом атомов серебра способствовало формированию электрического потенциала. В результате этого формировались ниосомы с атомами серебра на их поверхности меньших размеров по сравнению с чистыми ниосомами.

Изучение антимикробной активности ниосомального геля с доксорубицином показало, что препарат подавляет рост микроорганизмов. Так, в отношении *Staphylococcus aureus* зона задержки роста для ниосом, на поверхности которых находилось 50 мкМ серебра, составила  $16,8 \pm 0,14$  мм. Антимикробная активность препарата вдвое превышала активность ниосом: зона задержки роста была  $35,1 \pm 0,16$  мм (таблица, рис. 3). Для *Staphylococcus albus* зоны задержки роста составили  $15,2 \pm 0,11$  мм для серебряных ниосом и  $37,1 \pm 0,17$  мм для препарата. Зоны задержки роста *Staphylococcus epidermidis* составили  $12,9 \pm 0,21$  мм и  $38,7 \pm 0,29$  мм для ниосом и препарата соответственно. Ниосомы, на поверхности которых адсорбированы атомы серебра и противоопухольевый гель с доксорубицином и атомами серебра, достоверно подавляли рост *Micrococcus lysodeicticus*: зоны задержки роста были  $13,7 \pm 0,12$  и  $36,6 \pm 0,18$  соответственно. Аналогичная ситуация наблюдалась и по отношению к *Propionibacterium acne* (таблица, рис. 3).

Таким образом, установлено, что опытный образец разработанного геля обладал высокой антимикробной активностью ко всем видам изученных микроорганизмов. Причем

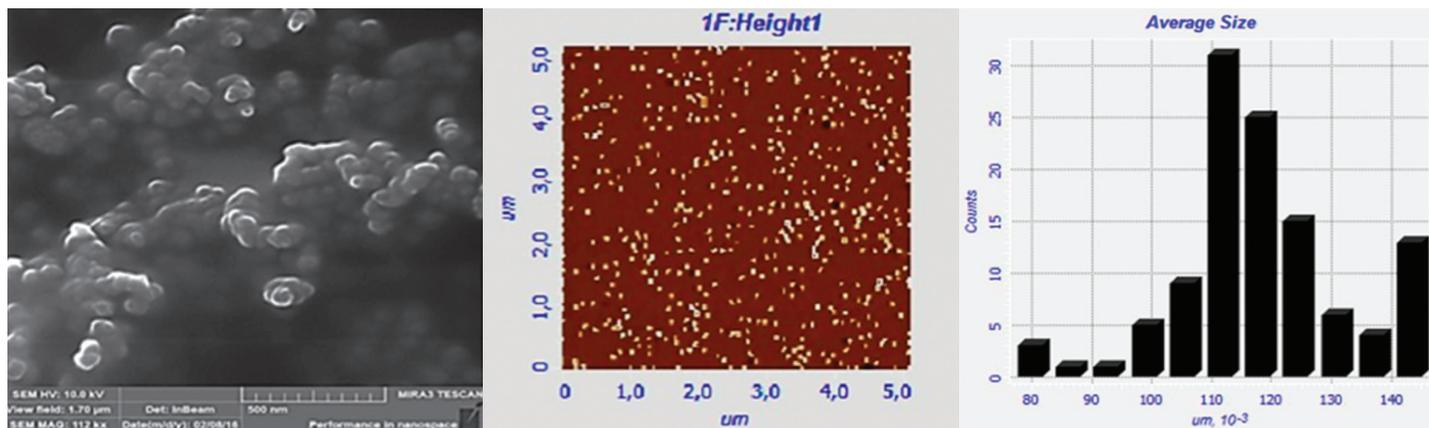


Рис. 1. Электронная и атомно-силовая микроскопия ниосом и гистограмма зависимости среднего размера ниосом к их количеству.

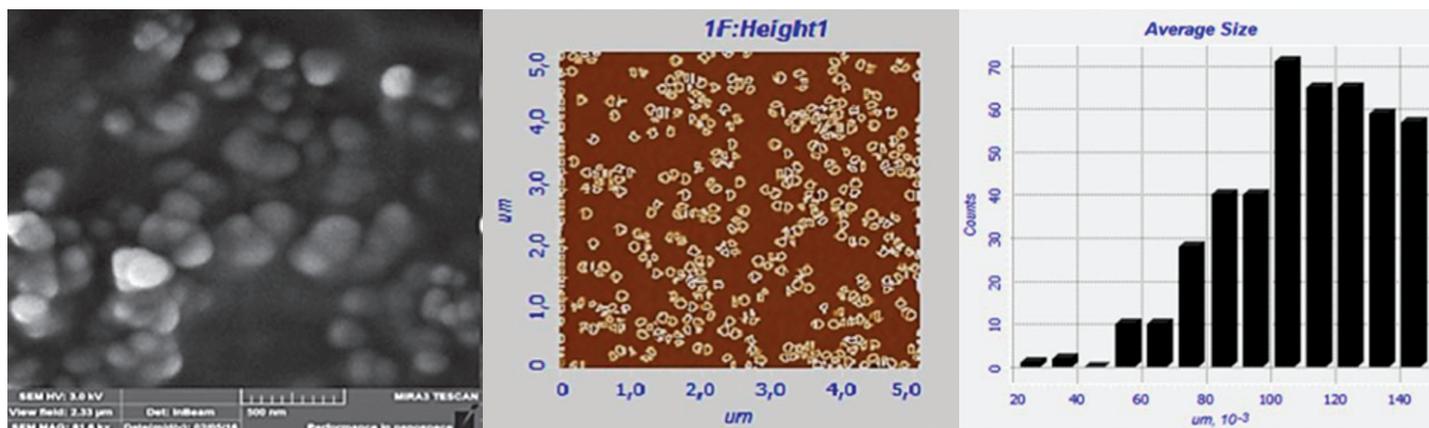


Рис. 2. Электронная и атомно-силовая микроскопия серебряных ниосом с доксорубицином и гистограмма зависимости среднего размера ниосом к их количеству.

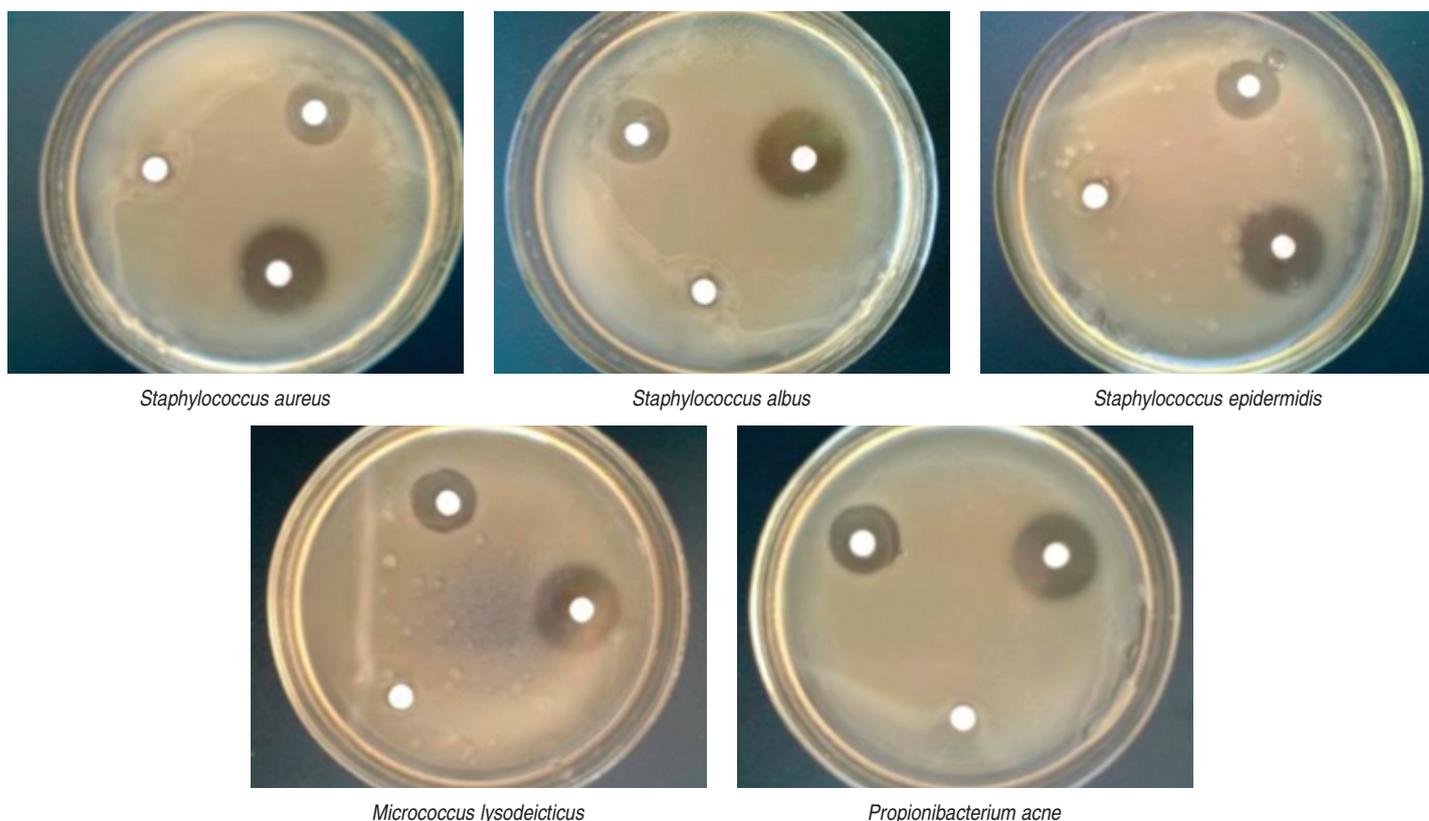


Рис. 3. Зоны задержки роста исследуемых микроорганизмов вокруг дисков, пропитанных посеребренными ниосомами и ниосомальным гелем с доксорубицином.

Таблица. Исследование чувствительности представителей семейства *Microssosaceae* к опытному образцу ниосомальной формы геля с доксорубицином диско-диффузным методом

Виды микроорганизма	Диаметр зоны задержки роста микроорганизма (мм) ( $D \pm d$ )*		
	Контроль	ниосомы с доксорубицином	серебряные ниосомы с доксорубицином
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	16,8 ± 0,14 *	35,1 ± 0,16 **, **
<i>Staphylococcus albus</i>	–	15,2 ± 0,11*	37,1 ± 0,17 **, **
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	12,9 ± 0,21*	38,7 ± 0,29 **, **
<i>Micrococcus lysodeicticus</i>	–	13, 7 ± 0,12*	36,6 ± 0,18 **, **
<i>Propionibacterium acne</i>	–	15, 7 ± 0,12*	37,6 ± 0,28 **, **

\* $p < 0,05$  – в сравнении с контрольной группой;  
\*\* $p < 0,05$  – в сравнении с серебряными ниосомами.

присутствие серебра усиливало действие препарата, что подтверждается литературными данными, полученными при изучении антимикробной активности доксорубицина. Ранее было показано, что уровень антимикробной активности достаточно высок для опытных штаммов *S. aureus* (МИК 7,08 мкг/мл при диапазоне значений от 25 до 1,5 мкг/мл) [14]. Согласно другим данным, значения МИК различных препаратов антрациклиновой группы для стандартных штаммов *S. aureus* составляют от 2,5 до 60 мкг/мл [6, 15]. Одним из механизмов антимикробного действия доксорубицина является способность индуцировать процессы свободно-радикального окисления. В литературе имеется информация об изменении физико-химических параметров клеточной поверхности у резистентных к антибиотикам микроорганизмов. Так, у стафилококков и эшерихий, резистентных к пенициллинам, клеточная стенка становится менее гидрофильной, у микроорганизмов, резистентных к стрептомицину – более гидрофильной [16]. Согласно нашим данным, при взаимодействии ниосомальной формы доксорубицина проницаемость плазматической мембраны повышалась, что способствовало увеличению поступления антибиотика внутрь микробной клетки [17].

Фармакокинетические параметры антрациклинов могут предполагать реализацию их антимикробного эффекта в зоне локального воспаления, поскольку накопление их в количествах, близких к опытным, происходит в тканях [18]. Таким образом, введение в практику ниосомальных форм цитостатиков, способствующих сохранению препарата в крови в более высоких концентрациях и преимущественному проникновению в опухолевый и воспалительный очаги, имеет несомненную перспективу [10–13, 17, 19, 20].

## Литература

1. Волкова ЗВ. Причины развития инфекции у онкологических больных. XI Российский онкологический конгресс, 2007.
2. Кузьмина ЕГ, Неприна ГС, Ватин ОЕ, Сироткина НП, Рогова НМ, Крикунова ЛИ. Коррекция вторичных иммунодефицитных состояний, индуцированных химиолучевой терапией у онкологических больных. Российский онкологический журнал. 2003;2:32-6.
3. Особенности течения инфекционных процессов у детей с онкологической патологией. Цикл лекций по детской онкологии. Российский биомедицинский журнал. 2001;2(38):176-8. (Online). Доступно по: [http://www.medline.ru/public/art/tom2/art38\\_4.phtml](http://www.medline.ru/public/art/tom2/art38_4.phtml)

4. Севостьянова НВ, Исаева ТМ, Уразова ЛН. Особенности иммунологических показателей у онкобольных. Вопросы онкологии. 2001;47(4):446-8.
5. Blijlevens N, Schwenkgenks M, Bacon P, D'Addio A, Einsele H, Maertens J, et al. Prospective oral mucositis audit: oral mucositis in patients receiving high-dose melphalan or BEAM conditioning chemotherapy – European Blood and Marrow Transplantation Mucositis Advisory Group. J Clin Oncol. 2008 Mar 20;26(9):1519-25. doi: 10.1200/JCO.2007.13.6028
6. Федорова ГБ, Голова ТП, Архангельская НМ, и др. Рубомицин Q1 – антрациклиновый метаболит из рубомицин С-продуцирующего штамма *Streptomyces coeruleorubidus* 2679. Антибиотики и химиотерапия. 1996;41(3):3-8.
7. Anand A, Glatt AE. Clostridium difficile infection associated with antineoplastic chemotherapy: a review. Clin Infect Dis. 1993 Jul;17(1):109-13.
8. Emoto M, Kawarabayashi T, Hachisuga MD, Eguchi F, Shirakawa K Clostridium difficile colitis associated with cisplatinbased chemotherapy in ovarian cancer patients. Gynecol Oncol. 1996 Jun;61(3):369-72
9. Thielman NM. Antibiotics-associated colitis. Principles and practice of infectious diseases. Mandell GL, Bennet IE, Dolin R. (ed.). Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000, pp. 1111-26.
10. Базиков ИА. Новый антимикробный гель с ниосомами кремнийорганической природы. Проблемы медицинской микологии. 2015;17(2):41.
11. Базиков ИА, Бейер ЭВ, Лукинова ВВ, Мальцев АН. Сравнительная оценка острой токсичности доксорубицина и его ниосомальной формы. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2015;10(4):403-6. DOI: 10.14300/mnnc.2015.10098
12. Bazikov IA, Chekrygina EV, Klimanovich IV, Maltcev AN. Development of a pharmaceutical anticancer gel based on doxorubicin and silicone nanotechnology. Medical news of North Caucasus. 2015;10(2):163-6.
13. Базиков ИА. Способ трансдермального переноса активных субстанций с использованием ниосом на основе ПЭГ-12 диметикона. Патент на изобретение RU 2539396 02.12.2014.
14. Шаповал ОГ. Влияние доксорубицина и антибиотиков на динамику развития популяций *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Саратовский научно-медицинский журнал. 2010;6(1):40-2.
15. Шорин ВА, Авербух ЯА. Изучение перекрестной устойчивости у опухолевых клеток и стафилококков в отношении противоопухолевых антибиотиков из группы антрациклинов. Антибиотики. 1976;21(10):914-9.
16. Попова НА. Физико-химические параметры поверхности бактерий и способность связывать пенициллин в связи с чувствительностью к пенициллинам и стрептомицину. Антибиотики. 1976;21(10):897-902.
17. Базиков ИА, Лукинова ВВ, Мальцев АН, Дискаева ЕИ, Айтекова СР. Взаимодействие ниосомального доксорубицина с мембранами клеток. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;1(11):108-10. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11011
18. Птушкин ВВ. Лечение и профилактика инфекций у больных с нейтропенией. Материалы III ежегодной Российской онкологической конференции 29 ноября–1 декабря 1999 г., Санкт-Петербург.
19. Пивник АВ, Строяковский ДЛ, Медведев ПВ, Моисеева ТН, Шкловский-Корди НЕ, Скороход АА. Липосомальный даунорубицин (даунозом) в лечении рецидива острого промиелобластного лейкоза. Терапевтический архив. 1999; 71(7):24-7.
20. Каплун АП, Ле Банг Шон, Краснополский ЮМ, Швец ВИ. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ. Вопросы медицинской химии. 1999;45(1):3-12.

## References

1. Volkova ZV. The reasons for the development of infection in cancer patients. XI Russian oncologic Congress, 2007. (In Russian).
2. Kuzmina EG, Neprina GS, Vatin OE, Sirotkina NP, Rogova NM, Krikunova LI. Correction of secondary immunodeficiency induced by chemoradiotherapy in

- cancer patients. Rossiiskii onkologicheskii zhurnal (Russian Journal of Oncology). 2003;2:32-6. (In Russian).
3. Osobennosti techeniya infektsionnykh protsessov u detei s onkologicheskoi patologiei. Tsikl lektsii po detskoj onkologii. Rossiiskii biomeditsinskii zhurnal. 2001;2(38):176-8. (Online). Available at: [http://www.medline.ru/public/art/tom2/art38\\_4.phtml](http://www.medline.ru/public/art/tom2/art38_4.phtml) (In Russian). [http://www.medline.ru/public/art/tom2/art38\\_4.phtml](http://www.medline.ru/public/art/tom2/art38_4.phtml)
  4. Sevostyanova NV, Isaeva TM, Urazova LN. Features of immunologic and virusologic indicators in oncology patients. Voprosy onkologii (Problems in Oncology). 2001;47(4):446-8. (In Russian).
  5. Blijlevens N, Schwenkgenks M, Bacon P, D'Addio A, Einsele H, Maertens J, et al. Prospective oral mucositis audit: oral mucositis in patients receiving high-dose melphalan or BEAM conditioning chemotherapy – European Blood and Marrow Transplantation Mucositis Advisory Group. J Clin Oncol. 2008 Mar 20;26(9):1519-25. DOI: 10.1200/JCO.2007.13.6028
  6. Fedorova GB, Golova TP, Arkhangel'skaya NM, Lazhko EI, Abramova EA, Bychkova OP, et al. Rubomycin Q1, an anthracycline metabolite synthesized by *Streptomyces coeruleorubidus* 2679, a strain producing rubomycin C. Antibiotics and Chemotherapy. 1996;41(3):3-8. (In Russian).
  7. Anand A, Glatt AE. Clostridium difficile infection associated with antineoplastic chemotherapy: a review. Clin Infect Dis. 1993 Jul;17(1):109-13.
  8. Emoto M, Kawarabayashi T, Hachisuga MD, Eguchi F, Shirakawa K Clostridium difficile colitis associated with cisplatinbased chemotherapy in ovarian cancer patients. Gynecol Oncol. 1996 Jun;61(3):369-72
  9. Thielman NM. Antibiotics-associated colitis. Principles and practice of infectious diseases. Mandell GL, Bennet IE, Dolin R. (ed.). Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000, pp. 1111-26.
  10. Bazikov IA. Novyi antimikrobnii gel' s niosomami kremniorganicheskoi prirody. Problems in Medical Mycology. 2015;17(2):41. (In Russian).
  11. Bazikov I, Beyer E, Maltsev A, Goptareva E, Malinina N, Botasheva V, Dushko S. Study of hepatotoxicity of niosomal form of doxorubicin. Medical news of the North Caucasus. 2015;10(4):403-6. DOI: 10.14300/mnnc.2015.10098 (In Russian).
  12. Bazikov IA, Chekrygina EV, Klimanovich IV, Maltsev AN. Development of a pharmaceutical anticancer gel based on doxorubicin and silicone nanotechnology. Medical news of North Caucasus. 2015;10(2):163-6.
  13. Bazikov IA. Method of transdermal transfer of active substances with the use of the NREs based on PEG-12 Dimethicone. The patent for the invention RUS 2539396 02.12.2014. (In Russian).
  14. Shapoval OG. Doxorubicine and antibiotics influence on dynamics of population development of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2010;6(1):40-2. (In Russian).
  15. Shorin VA, Averbukh JIA. Izuchenie perekrestnoi ustoychivosti u opukholevykh kletok i stafilokokkov v otnoshenii protivopukholevykh antibiotikov iz gruppy antratsiklinov. Antibiotiki. 1976;21(10):914-9. (In Russian).
  16. Popova HA. Fiziko-khimicheskie parametry poverkhnosti bakterii i sposobnost' svyazyvat' penitsillin v svyazi s chuvstvitel'nost'yu k penitsillinam i streptomitsinu. Antibiotiki. 1976;21(10):897-902. (In Russian).
  17. Bazikov I, Maltsev A, Diskaeva E, Lukinova V, Aytikov S. Interaction niosomal doxorubicin cell membranes. Medical news of the North Caucasus. 2016;1(11):108-10. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11011 (In Russian).
  18. Ptushkin VV. Treatment and prevention of infections in patients with neutropenia. Proceedings of the III annual Russian Oncology conference, 29 Nov–1 Dec 1999, Saint Petersburg. (In Russian).
  19. Pivnik AB, Stroyakovskii DL, Medvedev PV, Moiseeva TN, Shklovskii-Kordi NE, Skorokhod AA. Liposomal'nyi daunorubitsin (daunozom) v lechenii retsidiva ostrogo promieloblastnogo leikoza. Terapevticheskiy arkhiv (Therapeutic Archive). 1999;71(7):24-7. (In Russian).
  20. Kaplun AP, Le Bang Son, Krasnopolsky YuM, Shvets VI. Liposomes and others nanoparticles as the drug delivery systems. Voprosy meditsinskoi khimii. 1999;45(1):3-12. (In Russian).

---

**Информация о авторах:**

Мальцев Александр Николаевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биологически активных веществ ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310

Телефон: (8652) 35-2475

E-mail: Maltsev7@rambler.ru

Зеленский Владимир Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей практики и детской стоматологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310

Телефон: (8652) 35-2475

Королькова Виолетта Игоревна, заочный аспирант кафедры стоматологии детского возраста ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310

Телефон: (8652) 35-2475

Калинкина Наталья Ивановна, заочный аспирант кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310

Телефон: (8652) 35-2475

Гоптарева Екатерина Алексеевна, заочный аспирант кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310

Телефон: (8652) 35-2475

---

**Information about authors:**

Aleksandr N. Mal'tsev, PhD, Head of laboratory of biologically active substances, Stavropol State Medical University

Address: 310 Mira Str., Stavropol', 355017, Russian Federation

Phone: (8652) 35-2475

E-mail: Maltsev7@rambler.ru

Vladimir A. Zelensky, Sc.D., Head of the Department of general practice and pediatric dentistry Stavropol State Medical University

Address: 310 Mira Str., Stavropol', 355017, Russian Federation

Phone: (8652) 35-2475

Violetta I. Korol'kova, postgraduate student of the Department of pediatric dentistry, Stavropol State Medical University

Address: 310 Mira Str., Stavropol', 355017, Russian Federation

Phone: (8652) 35-2475

Natal'ya I. Kalinkina, postgraduate student of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University

Address: 310 Mira Str., Stavropol', 355017, Russian Federation

Phone: (8652) 35-2475

Ekaterina A. Goptareva, postgraduate student of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University

Address: 310 Mira Str., Stavropol', 355017, Russian Federation

Phone: (8652) 35-2475

# Обратимость микробиологически индуцированной коррозии под воздействием изменения условий окружающей среды

В.Б.Родин<sup>1</sup>, С.К.Жиглецова<sup>1</sup>, Н.А.Акимова<sup>1</sup>, В.П.Холоденко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Пушинский государственный естественно-научный институт», Пушино, Российская Федерация

Исследована динамика коррозионных потерь мягкой стали, вызываемых биопленкой естественной микробной ассоциации при изменении условий культивирования. При формировании биопленки на глюкозо-минеральной среде коррозионные потери возрастали, а после перенесения стальных купонов с этой биопленкой в среду LB коррозионные потери уменьшались. В то же время при формировании биопленки на среде LB коррозионные потери относительно контроля были меньше, а после перенесения стальных купонов с этой биопленкой в глюкозо-минеральную среду они становились больше. При интенсивной аэрации наблюдался высокий уровень коррозионных потерь стальных купонов с биопленкой. Однако при смене режима аэрации на микроаэрофильный коррозионные потери резко падали. Полученные данные свидетельствуют, что совокупный метаболизм природной микробной ассоциации способен гибко реагировать на изменения условий культивирования, что приводит к ускорению или торможению коррозионных процессов. Это ставит под сомнение правильность общепринятого разделения микроорганизмов на деструкторы, ускоряющие коррозию, и пассиваторы, замедляющие ее.

Обсуждаются перспективы практического применения обнаруженных закономерностей микробиологически индуцированной коррозии при изменении условий окружающей среды для разработки новых экологически безопасных методов борьбы с коррозией металлов.

**Ключевые слова:** микробиологически индуцированная коррозия, биопленка, микробная ассоциация, деструкторы, ингибиторы

**Для цитирования:** Родин В.Б., Жиглецова С.К., Акимова Н.А., Холоденко В.П. Обратимость микробиологически индуцированной коррозии под воздействием изменения условий окружающей среды. Бактериология. 2017; 2(1): 66–72. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-66-72

## The reversibility of microbiologically induced corrosion under the influence of the change of environmental conditions

V.B.Rodin<sup>1</sup>, S.K.Zhigletsova<sup>1</sup>, N.A.Akimova<sup>1</sup>, V.P.Kholodenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

<sup>2</sup>Pushchino State Natural Science Institute, Pushino, Moscow Region, Russian Federation

The dynamics of the loss of mild steel corrosion caused by natural microbial biofilm association has been investigated under the change of culture conditions. Corrosion losses increased when the biofilm formed in glucose mineral medium, and corrosion losses decreased when the steel coupons with this biofilm have been transferred in LB medium. At the same time, corrosion losses were relatively smaller than in control when the biofilm formed in LB medium, and they became greater than after steel coupons with this biofilms have been transferred into glucose-mineral medium. A high level of corrosion losses of steel coupons observed with biofilms under intensive aeration. However, corrosion losses sharply decreased in microaerophilic conditions. The findings suggest that the overall metabolism of natural microbial consortium is able to respond flexibly to changes in culture conditions, which leads to an acceleration or deceleration of corrosion processes. This casts doubt on the correctness of the conventional subdivision of microorganisms on destructors which accelerate corrosion and inhibitors which slow it.

The prospects of practical application of the data obtained to develop new environmentally sound methods of controlling corrosion of metals are discussed.

**Keywords:** microbiologically induced corrosion (MIC), biofilm, microbial consortium, destructors, inhibitors

**For citation:** Rodin V.B., Zhigletsova S.K., Akimova N.A., Kholodenko V.P. The reversibility of microbiologically induced corrosion under the influence of the change of environmental conditions. Bacteriology. 2017; 2(1): 66–72. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-66-72

### Для корреспонденции:

Жиглецова Светлана Константиновна, к.х.н., старший научный сотрудник  
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии  
и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 1432279 Оболенск, Московская область,  
Серпуховской р-н, ГНЦПМБ  
Телефон: (4967) 36-0000; (4967) 36-0010  
E-mail: zhigletsova@obolensk.org

Статья поступила 28.11.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

### For correspondence:

Svetlana K. Zhigletsova, PhD, senior researcher, State Research Center  
for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow  
region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0000; (4967) 36-0010  
E-mail: zhigletsova@obolensk.org

The article was received 28.11.2016, accepted for publication 15.03.2017

**М**икробиологически индуцированная коррозия (МИК) разрушает сталь наряду с электрохимической и химической коррозией [1, 2]. Обычно с МИК борются при помощи биоцидов. В то же время известно, что в ряде случаев коррозия металлов уменьшалась и в присутствии микроорганизмов [3–5]. В результате в литературе получило широкое распространение разделение микроорганизмов на индуцирующих коррозию и защищающих от нее (деструкторы и пассиваторы соответственно).

подавляющее большинство исследований МИК проводилось в лабораторных условиях, далеких от естественных условий окружающей среды, с использованием искусственных питательных сред. Это обусловило необходимость изучения влияния различных факторов внешней среды на закономерности протекания биокоррозионных процессов. Проведенные нами в этой связи исследования показали, что независимо от видовой принадлежности микроорганизма процессы активации или ингибирования коррозии зависели от состава питательной среды [6–9]. Если питательный субстрат способствовал образованию кислых продуктов метаболизма, микроорганизм ускорял коррозию, но если потребление питательного субстрата сопровождалось выделением щелочных продуктов метаболизма, то тот же самый микроорганизм ее замедлял. При этом была обнаружена статистически достоверная корреляция между величиной коррозионных потерь и значением pH культуральной жидкости в конце инкубации.

Эти результаты указывают на то, что традиционное разделение микроорганизмов на деструкторы и пассиваторы по меньшей мере спорно. Мы можем только утверждать, что в зависимости от типа питательного субстрата микроорганизмы различаются в своей способности проявления деструктивных или защитных свойств. В последнее время эта точка зрения находит все большее подтверждение [10, 11].

Мы предположили, что это относится не только к исследованным чистым культурам, но и к естественным микробным ассоциациям. В связи с этим нами была исследована коррозионная активность четырех природных микробных ассоциаций, выделенных из различных экологических ниш, при разных условиях их культивирования [12]. Было установлено, что эти ассоциации, так же, как и чистые культуры, одинаковым образом изменяли свое воздействие на коррозионные процессы при смене типа питательного субстрата и режима аэрации, вызывая как увеличение, так и уменьшение коррозионных потерь.

Во всех проведенных нами ранее исследованиях инокуляция планктонных клеток в жидкую среду, колонизация поверхности металла, формирование и развитие биопленки происходили за достаточно короткое время и без целенаправленного изменения экспериментатором условий окружающей среды. Однако в природных условиях биопленки обычно формируются длительное время, в течение которого могут происходить резкие смены условий аэрации и состава питательного субстрата.

**Целью данной работы** являлась оценка воздействия смены типа питательного субстрата и режима аэрации на коррозионные процессы в присутствии зрелых сформировавшихся биопленок природных микробных ассоциаций.

## Материалы и методы

Объектом исследования являлась природная микробная ассоциация «Стоки», выделенная из нефтепромысловых вод Альметьевского месторождения (Татарстан). Ее основными компонентами являлись сульфатовосстанавливающие бактерии и аэробные гетеротрофные микроорганизмы.

В работе использовали следующие питательные среды: среда Лурия-Бертани (LB), глюкозо-минеральная среда с пептоном (ГМП), DSM – среда для выращивания сульфатовосстанавливающих бактерий (СВБ), приготовленная на водопроводной воде среда, содержащая минеральные соли и керосин как единственный источник углерода и энергии (МСК). Составы питательных сред приведены в [12].

После определенной экспозиции биопленку смывали со стальных купонов физиологическим раствором с помощью кисточки, гомогенизировали и определяли в смыве количество жизнеспособных аэробных гетеротрофов путем высева на чашки Петри с мясопептонным агаром. Определение концентрации СВБ осуществляли в среде DSM методом предельных разведений по продукту жизнедеятельности этих бактерий – сульфиду железа, дающему черный осадок.

Определение в культуральной жидкости концентрации ионов фосфата, сульфата, аммония и сероводорода проводили по стандартным методикам [13].

Культивирование на средах ГМП и LB проводили в микроаэрофильных условиях в пробирках с 10 мл среды, закрытых ватными пробками, в стационарном режиме. В этом случае стерильные контрольные и инокулированные микробной ассоциацией среды разливали в пробирки с купонами, закрывали ватными пробками и инкубировали при 28°C. Во время инкубации 1–2 раза в неделю отбирали культуральную жидкость (КЖ) и пять купонов для проведения химического и микробиологического анализа. Биопленку с поверхности 5 купонов смывали 10 мл физиологического раствора и проводили микробиологический анализ полученного смыва. После этого определяли коррозионные весовые потери в соответствии с методикой, изложенной в [13]. Через месяц инкубации из части пробирок со средой ГМП выливали КЖ и заполняли свежей средой LB. Одновременно с этим из части пробирок со средой LB выливали КЖ и заполняли свежей средой ГМП. После этого продолжали регулярный отбор купонов и КЖ для микробиологического и химического анализа.

На среде МСК использовали следующие варианты культивирования.

- Анаэробный: инкубация в конических колбах на 700 мл, закрытых ватными пробками с 700 мл среды в стационарном режиме. При этом площадь контакта среды с кислородом воздуха была минимальной. Весь поступающий кислород поглощался биопленкой аэробных нефтеокисляющих микроорганизмов, вырастающей под слоем керосина.

- Микроаэрофильный: инкубация в конических колбах на 700 мл, закрытых ватными пробками, с 200 мл среды в стационарном режиме. В данном случае отношение площади контакта среды с воздухом к объему среды гораздо больше по сравнению с предыдущим вариантом. Поэтому биопленка аэробных нефтеокисляющих микроорганизмов не полностью поглощала кислород, поступающий в питательную среду.

- Аэробный барботажный: инкубация в химическом стакане объемом 2 л с 1500 мл среды с барботажем воздухом.
- Аэробный на качалке: в конических колбах объемом 700 мл, с 200 мл среды, помещенных на качалку при 200 об/мин.

В наших экспериментальных условиях термины «анаэробный» и «микроаэрофильный» являются достаточно условными. Вводя их, мы имели в виду только то, что один из них в большей степени способствует созданию в процессе инкубации анаэробных, а другой – микроаэрофильных условий.

В опытах использовали обработанные 70%-ным этанолом подложки из полиэтилена размером 10 × 60 мм, в которых закрепляли диски из мягкой стали (купоны). Инокулированную и контрольную среду инкубировали при 28°C. Во время инкубации 1–2 раза в неделю вынимали подложку с купонами, определяли весовые потери купонов и производили отбор КЖ для проведения химического и микробиологического анализов.

При анаэробном и микроаэрофильном культивировании подложки с купонами помещали на дно колб, а при аэробном культивировании подвешивали на расстоянии 1 см от дна. В качестве контрольной среды использовали стерильную среду МСК без керосина. При аэробном и микроаэрофильном культивировании 1 раз в неделю в сосуды с микроорганизмами вносили свежую порцию керосина. При анаэробном культивировании аналогичную процедуру проводили 1 раз в 2 недели.

В опытах со сменой режима аэрации часть купонов с биопленками, выросшими в течение 2 недель при аэробном режиме культивирования, переносили в колбу с микроаэрофильными условиями, продолжая в дальнейшем регулярный отбор проб и купонов из сосудов с аэробными и микроаэрофильными режимами аэрации.

При определении коэффициента *k*, необходимого для расчета коррозионных потерь в стерильной среде МСК, анаэробный и микроаэрофильный режимы обеспечивали следующим образом:

- анаэробный: культивирование проводили в пробирках с завинчивающимися пластмассовыми пробками (Pirax®), полностью заполненных средой МСК;

- микроаэрофильный: культивирование проводили в микробиологических пробирках, содержащих 10 мл среды, закрытых ватными пробками.

### Результаты и обсуждение

Результаты микробиологического анализа показали, что во всех опытных вариантах на средах ГМП и LB уже через 7 дней инкубации численность как планктонных, так и входящих в состав биопленок гетеротрофных микроорганизмов достигала высоких значений ( $10^7$ – $10^8$  КОЕ/мл ( $\text{см}^2$ )) и оставалась неизменной в течение всего эксперимента.

В присутствии микробной ассоциации на среде LB происходило защелачивание среды до pH 8,0–8,5 и сильное (в 40 раз относительно стерильного контроля) ингибирование коррозии. При переносе купонов с биопленкой, выросшей на среде LB, в среду ГМП коррозионные потери возрастали, и их скорость становилась в 7 раз больше, чем в стерильной среде ГМП (рис. 1а).

В присутствии микробной ассоциации на среде ГМП наблюдалось слабое, до pH 6,7, закисление среды и увеличение коррозионных потерь по сравнению со стерильным контролем примерно в 4 раза. При переносе купонов с биопленкой, выросшей на среде ГМП, в среду LB скорость коррозии уменьшалась до значений, характерных для инокулированной среды LB (рис. 1б).

При постановке опытов по определению динамики коррозионных потерь на среде МСК оказалось невозможным сохранение стерильности в контроле, особенно при аэробном способе культивирования. Для решения этой проблемы было предложено использовать в качестве контроля среду МСК без керосина. Предполагалось, что в такой среде, лишенной источника углерода и энергии, микроорганизмы не будут развиваться. В то же время отсутствие керосина не должно было существенно сказаться на скорости коррозии, поскольку растворимость его в воде очень мала.

Для проверки этого предположения нами были поставлены опыты по оценке влияния отсутствия керосина на корро-

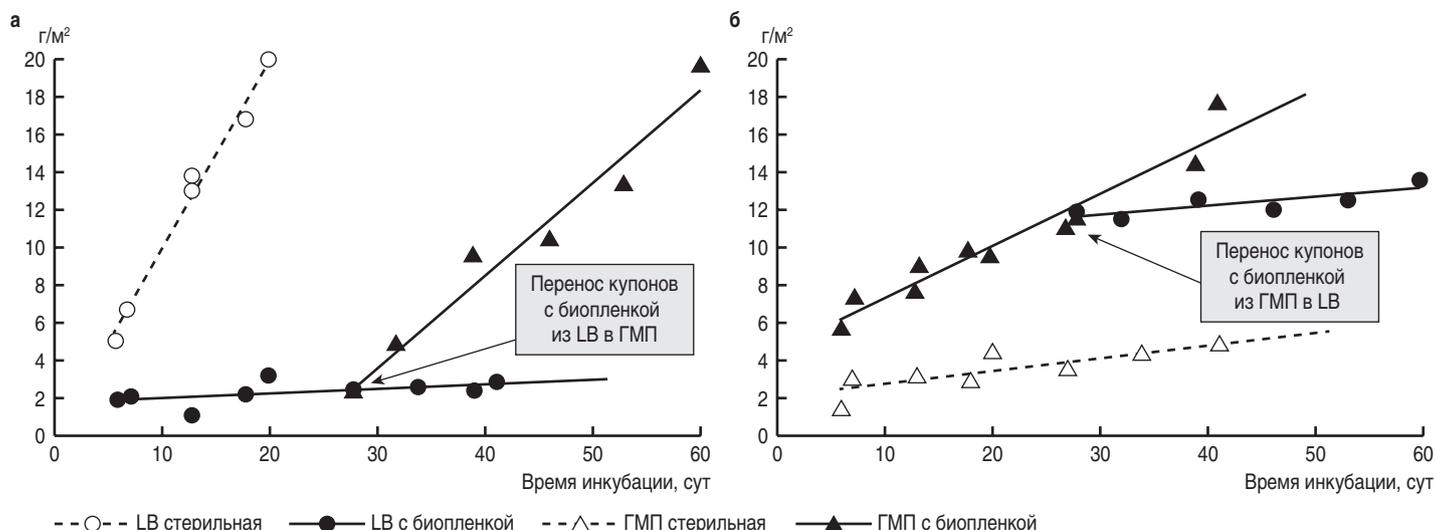


Рис. 1. Динамика коррозионных потерь под биопленкой природной микробной ассоциации при смене питательного субстрата: а – биопленка, выросшая на среде ГМП, переносилась на среду LB; б – биопленка, выросшая на среде LB, переносилась на среду ГМП.

Таблица. Определение коэффициента  $k$ , необходимого для расчета коррозионных потерь в стерильной среде МСК

Время инкубации, сут	Анаэробные условия				Микроаэрофильные условия			
	Коррозионные потери, г/м <sup>2</sup> с керосином (+K)	без керосина (-K)	Отдельные значения	$k = (+K)/(-K)$ среднее	Коррозионные потери, г/м <sup>2</sup> с керосином (+K)	без керосина (-K)	Отдельные значения	$k = (+K)/(-K)$ среднее
7	3,69	3,57	1,04	0,77 ± 0,16	6,11	6,62	0,92	0,79 ± 0,10
15	7,13	9,17	0,78		14,27	17,32	0,82	
22	7,64	12,10	0,63		19,62	25,61	0,77	
36	18,47	25,48	0,73		35,67	56,69	0,63	
42	12,74	14,78	0,86		56,05	70,96	0,79	
49	12,36	20,64	0,60		57,20	73,50	0,78	

зионные потери в стерильной среде МСК. Опыты проводили в микроаэрофильных и анаэробных условиях.

Как видно из результатов, представленных в таблице, независимо от интенсивности аэрации скорость коррозии на среде с керосином оказалась примерно на 20% меньше, чем без него. Полученный результат позволил определить значение коэффициента пересчета  $k = 0,78$ , благодаря которому стало возможным рассчитывать коррозионные потери в стерильной среде МСК по формуле:

$$(+K) = 0,78 \times (-K),$$

где  $(+K)$  – коррозионные потери на среде с керосином,  $(-K)$  – коррозионные потери на среде без керосина.

В процессе инкубации микробной ассоциации на среде МСК наблюдалась интенсивная утилизация керосина. Результаты микробиологического анализа показали, что независимо от режима аэрации во всех опытных вариантах уже через 7–15 дней инкубации численность планктонных и входящих в состав биопленки микроорганизмов достигала высоких значений (аэробных гетеротрофов –  $10^7$ – $10^8$  КОЕ/мл (см<sup>2</sup>), СВБ –  $10^6$ – $10^8$  бактерий /мл (см<sup>2</sup>)), которые оставались неизменными в течение всего эксперимента.

Во всех вариантах культивирования в среде МСК на протяжении всего периода инкубации концентрации ионов сульфата и аммония мало отличались от исходных значений. В то же время концентрация фосфатов как в стерильной, так и в инокулированных средах уже через неделю культивирования уменьшалась на два порядка, а в последующем определялась на уровне следовых значений. Это было вызвано тем, что ионы кальция и магния, которые присутствовали во входящей в состав среды МСК водопроводной воде, образовывали с фосфат-ионами белый осадок, который скапливался на дне сосудов и на поверхности купонов.

В анаэробных и микроаэрофильных условиях, начиная с 10–15 дней инкубации, наблюдалось почернение среды. При этом концентрация сероводорода в культуральной жидкости как в микроаэрофильных, так и в анаэробных условиях была примерно одинакова и не превышала 10 мг/л.

Во всех вариантах культивирования в стерильной среде МСК наблюдалось защелачивание среды. В присутствии микробной ассоциации в микроаэрофильных условиях и при аэрации на качалке наблюдалось сильное закисление культуральной жидкости. В то же время в анаэробных условиях и при аэробном барботаже на протяжении всего периода инкубации значения pH колебались вблизи нейтральных значений.

В присутствии микробной ассоциации в стационарных микроаэрофильных и анаэробных условиях на среде МСК

наблюдалось одинаково сильное ингибирование коррозии относительно стерильной среды (рис. 2).

При аэрации на качалке в стерильной среде имели место очень высокие коррозионные потери, однако в присутствии микробной ассоциации они уменьшались примерно в два раза, а при переносе купонов с биопленкой в микроаэрофильные условия практически полностью прекращались (рис. 3а).

В отличие от этого, при аэробном барботаже коррозионные потери в присутствии микроорганизмов были приблизительно в 2 раза выше, чем в стерильной среде. Последние, в свою очередь, были на порядок меньше коррозионных потерь в стерильной среде при аэрации на качалке. Как и в предыдущем случае, перенос купонов с биопленкой в микроаэрофильные условия приводил к практически полной остановке коррозии (рис. 3б).

В целом полученные результаты подтвердили наше предположение об определяющем значении условий окружающей среды на характер и направление микробиологического воздействия на коррозионные процессы зрелых биопленок естественных микробных ассоциаций. При этом обнаруженные в этой работе особенности МИК, так же, как и в случае чистых культур и «молодых» биопленок, по-прежнему могут быть объяснены на основе закономерностей электрохимической коррозии.

Так, биопленка, ранее ингибирующая коррозию на среде LB, после переноса на среду ГМП начинала ускорять коррозию, а биопленка, ранее ускоряющая коррозию на

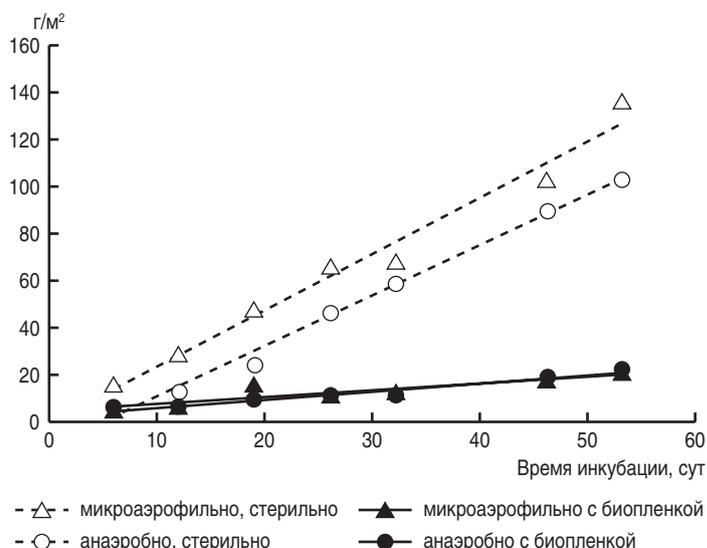


Рис. 2. Динамика коррозионных потерь на среде МСК в стационарных условиях при разных режимах аэрации.

среде ГМП, после переноса на среду LB начинала ингибировать коррозию (рис. 1). В данном случае ключевым фактором, определяющим направление биокоррозионного процесса, была способность микроорганизмов выделять либо кислые, либо щелочные продукты метаболизма. Кроме этого, на среде ГМП микробиологически индуцированное ускорение коррозии происходило, по-видимому, за счет устранения микробами пассивирующего эффекта фосфатной пленки.

В свою очередь, на среде МСК коррозионные потери, по всей видимости, зависели от концентрации кислорода и сероводорода под биопленкой. В микроаэрофильных и анаэробных условиях из-за поглощения биопленкой кислорода коррозионные потери были существенно меньше по сравнению со стерильным контролем (рис. 2). Именно поэтому при переносе купонов со сформировавшейся в аэробных условиях биопленкой в микроаэрофильные условия она практически полностью ингибировала коррозию (рис. 3).

Однако в результатах, полученных на среде МСК, есть и отличия от ранее опубликованных данных. В прошлой серии экспериментов [12] мы вносили керосин в инокулированную среду лишь однажды в начале эксперимента. При этом отмечалось только слабое закисление среды при культивировании на качалке и в стационарных микроаэрофильных условиях. В настоящей работе в течение инкубации мы вносили керосин еженедельно. Видимо, из-за этого при интенсивном аэробном, а также микроаэрофильном способе культивирования произошло сильное закисление среды, вызванное биodeградацией большого количества керосина. В то же время при барботажной аэрации и при анаэробном способе культивирования сильного закисления культуральной жидкости не происходило. Причина этого и в том, и другом случае, по-видимому, заключалась в разной величине отношения площади контакта биопленки с керосином (S) к объему (V) культуральной жидкости, поскольку площадь контакта определяет количество продуктов метаболизма керосина (в данном случае – жирных кислот), а объем среды – их концентрацию. Так, наибольшую площадь контакта обеспечивало культивирование на качалке, поскольку

при этом керосин находился в эмульгированном состоянии. Далее следуют микроаэрофильные условия ( $S/V = 0,13 \text{ м}^2/\text{л}$ ), затем культивирование с барботажом ( $S/V = 0,03 \text{ м}^2/\text{л}$ , при этом керосин не эмульгировался, а только покрывал поверхность культуральной жидкости в сосуде) и анаэробные условия ( $S/V = 0,007 \text{ м}^2/\text{л}$ ).

На первый взгляд, сильное закисление среды МСК не согласуется с фактом ингибирования коррозии при аэрации на качалке и в микроаэрофильных условиях. Ведь столь сильное закисление культуральной жидкости должно было вызвать не замедление, а ускорение коррозии, так, как это происходило в среде ГМП [6, 7]. Однако, если в среде ГМП определяемый питательным субстратом метаболизм находящихся в культуральном сосуде клеток одинаков, то на среде МСК ситуация совершенно иная. В условиях наших экспериментов на среде МСК образовывалось два вида биопленок, которые, прежде всего, отличались по типу используемого питательного субстрата. Первая – это биопленка нефтеокисляющих микроорганизмов, которая развивалась на границе раздела фаз керосин/вода. Она осуществляла аэробное окисление керосина и переводила углеводороды в растворимые в воде жирные кислоты. Их накопление приводило к закислению культуральной жидкости. Вторая – это биопленка, которая образуется на поверхности металлических купонов. Она развивалась, используя в качестве питательного субстрата растворенные в воде продукты биodeградации керосина. Утилизируя растворенные в воде жирные кислоты, эта биопленка нейтрализовывала кислую реакцию среды в прилегающей к поверхности металла водной фазе. С другой стороны, почернение биопленки из-за накопления в ней сульфида железа, появление сероводорода в культуральной жидкости, а также результаты микробиологического анализа смывов с поверхности купонов свидетельствовали об активности входящих в состав биопленки сульфатвосстанавливающих бактерий. Обычно их относят к коррозионно опасной группе микроорганизмов, однако роль их в коррозионных процессах далеко не однозначна. Хорошо известно, что восстановление СВБ сульфата до сульфида приводит к защелачиванию среды. Также установлено, что

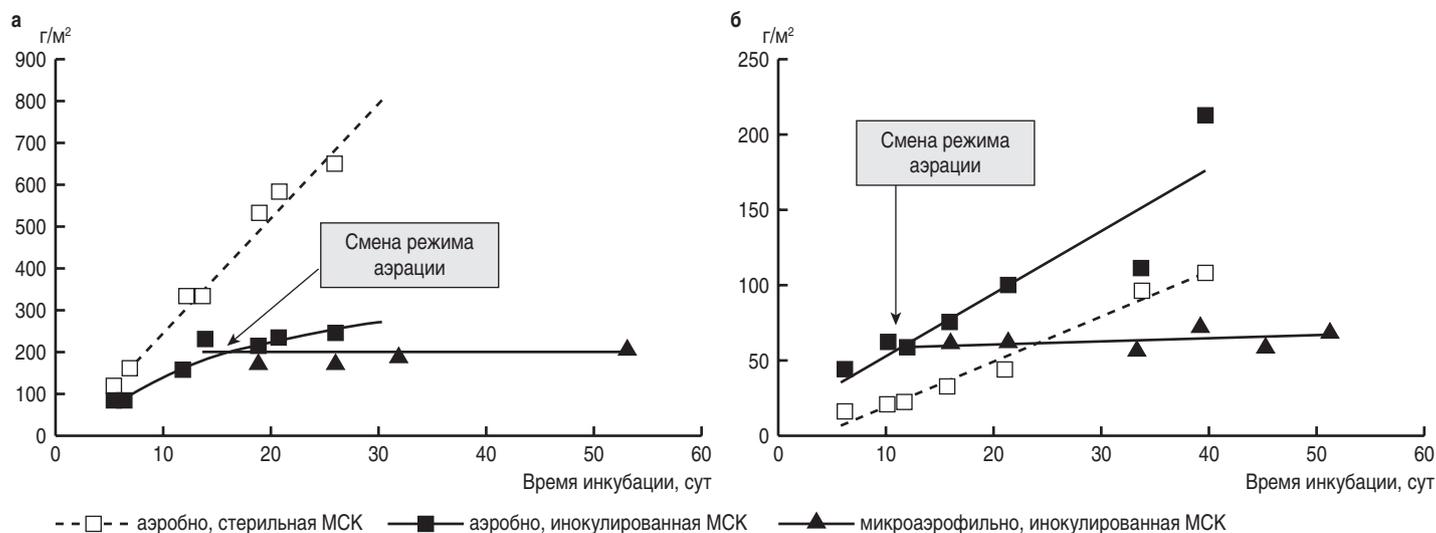


Рис. 3. Динамика коррозионных потерь на среде МСК при смене режима аэрации: а – аэробный на качалке; б – аэробный барботажный.

образующаяся в результате деятельности СВБ пленка из сульфида железа ингибирует коррозию [14]. Таким образом, защитный эффект биопленки, образующейся при интенсивной аэрации на качалке и в микроаэрофильных условиях, помимо поглощения ею кислорода, можно объяснить нейтрализацией жирных кислот и защелачиванием прилегающей к поверхности металла водной фазы.

Вторым следствием периодического еженедельного введения керосина в опытах со средой МСК, очевидно, было ингибирование коррозии микроорганизмами в условиях интенсивной аэрации на качалке (рис. 3а), в то время как при однократном введении его в начале эксперимента не было отмечено существенного влияния микроорганизмов на коррозию [6]. Однократное введение керосина, по-видимому, не обеспечивало биопленку достаточным для выполнения защитной функции запасом питательных веществ.

Наиболее интересный, на наш взгляд, результат был получен в опыте со сменой режима аэрации с аэробного барботажного на микроаэрофильный (рис. 3б). По сравнению с режимом аэрации на качалке (рис. 3а), скорость коррозии при аэробном барботаже в стерильной среде упала на порядок, очевидно, не только за счет уменьшения интенсивности аэрации, но и за счет образования осадков фосфатов, создавших дополнительный барьер, препятствовавший доступу кислорода к поверхности металла. В то же время скорость коррозии в присутствии микроорганизмов при уменьшении интенсивности аэрации снизилась примерно в 3 раза по сравнению с аэрацией на качалке. Возможно, это связано с тем, что при формировании биопленки одновременно с осаждением неорганических отложений, что и происходило в данном случае, образовывалась структура более рыхлая, чем в случае только неорганических осадков в стерильной среде. Таким образом, формирование неорганических осадков привело к тому, что при уменьшении интенсивности аэрации скорость коррозии в присутствии микроорганизмов оказалась выше, чем в стерильной среде. Тем не менее, дальнейшее снижение интенсивности аэрации до микроаэрофильного режима привело к практически полной остановке коррозионных процессов в присутствии микроорганизмов.

В реальных условиях образование биопленки обычно идет одновременно с образованием большого количества различных неорганических отложений, из-за чего ее иногда даже трудно обнаружить [2]. Полученный результат показывает, что образование неорганических осадков может оказывать существенное влияние на коррозионное воздействие микроорганизмов. Однако даже в этом случае резкая смена режима аэрации может привести к переходу от разрушающего воздействия биопленки к защитному эффекту.

Таким образом, данная работа подтвердила сделанное ранее заключение о спорности определяющего значения для МИК разделения микроорганизмов на деструкторы и пассиваторы. Полученные результаты показали, что совокупный метаболизм природных микробных ассоциаций способен гибко реагировать на изменения условий окружающей среды, ускоряя или замедляя коррозионные процессы. Эти закономерности могут быть положены в основу новых, экологически безопасных методов борьбы с коррозией, которые, в общих чертах, представляются нам следующим образом.

Работу следует начинать с модельных экспериментов. Если их результаты в совокупности с данными микробиологического и химического анализа технологической системы будут свидетельствовать о наличии в ней биокоррозионных процессов, то, прежде всего, необходимо визуально и по данным микробиологического анализа определить возраст и активность биопленки.

В том случае, если биопленка только формируется и активна, то бороться с ней можно при помощи имеющихся на рынке биоцидов. Если же в технологической системе присутствует зрелая и мощная биопленка, использование биоцидов становится малоэффективным, и поэтому предпочтение должно отдаваться биологическим методам борьбы. Эти методы должны разрабатываться с учетом следующих положений.

1. Максимальный защитный эффект от МИК биологическим способом возможен только при наличии микроаэрофильных или анаэробных условий. В аэробных условиях биозащита возможна только при наличии на металлических поверхностях объемных биообращаний, внутри которых создаются микроаэрофильные или анаэробные условия.

2. Биозащитный эффект возникает как за счет поглощения биопленками кислорода, так и в результате продуцирования ими щелочных продуктов метаболизма. В соответствии с этим биозащитный эффект может возникать после введения в технологические воды пептонов или других азотсодержащих органических веществ, при ферментации которых выделяются щелочные продукты метаболизма, а также минеральных солей (нитратов, аммония, фосфатов), способствующих ускорению роста микроорганизмов и, соответственно, усилению потребления ими кислорода. В то же время необходимо иметь в виду, что это может привести к ускорению нежелательных процессов биообращения. Поэтому этот метод будет эффективен только в том случае, если вводимые вещества будут добавляться в оптимальных количествах, которые, с одной стороны, будут достаточны для того, чтобы обеспечить биозащитный эффект, а с другой, окажутся недостаточными для усиления биообращения. В связи с этим оптимальные дозы и режимы подачи вводимых веществ должны быть предварительно определены по результатам отдельных модельных экспериментов.

3. Усиление микроорганизмами коррозии имеет место при продуцировании ими таких коррозионно-агрессивных веществ, как сероводород и кислоты. В соответствии с этим для предотвращения усиления МИК в технологические воды не должны попадать такие кислотообразующие продукты, как углеводы и углеводороды, а также сульфаты и сульфиды, которые используются СВБ с образованием коррозионно-агрессивного сероводорода.

Таким образом, в целом полученные результаты открывают широкое поле деятельности не только для изучения, но и управления коррозионными процессами в реальных условиях эксплуатации промышленного оборудования.

*Исследование выполнено в рамках Отраслевой программы Роспотребнадзора «Разработка способов профилактики техногенных аварий, вызываемых биокоррозией технологического оборудования, для повышения биобезопасности микробиологических исследований» (на 2006–2010 гг.).*

## Литература

- Videla HA. Manual of Biocorrosion. N.-Y.: CRC Press Inc., 1996, 273 p.
- Borenshtein SW. Microbiologically influenced corrosion handbook. N.-Y.: Industrial Press Inc., 1994, 208 p.
- Pedersen A, Hermansson M. The effects on metal corrosion by *Serratia marcescens* and a *Pseudomonas* sp S9. Biofouling. 1989;1:313-22.
- Jayaraman A, Eartman JC, Wood TK. Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel. Appl Microbiol Biotechnol. 1997;47(1):62-8.
- Potekhina JS, Sherisheva NG, Potekhina LP, Pospelov AP, Rakitina TA, Warnecke F, et al. Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats. Appl Microbiol Biotechnol. 1999;52(5):639-46.
- Rodin VB, Jigletsova SK, Kobelev VS, Akimova NA, Aleksandrova NV, Rasulova GE, et al. Development of biological methods for controlling the aerobic microorganism-induced corrosion of carbon steel. Appl Biochem Microbiol. 2000;36(6):589-93.
- Jigletsova SK, Rodin VB, Kobelev VS, Aleksandrova NV, Rasulova GE, Kholodenko VP. Studies of initial stages of biocorrosion of steel. Appl Biochem Microbiol. 2000;36(6):550-4.
- Jigletsova SK, Rodin VB, Kobelev VS, Akimova NA, Aleksandrova NV, Rasulova GE, et al. Use of biocides as agents against microorganism-induced corrosion increases ecological safety. Appl Biochem Microbiol. 2000;36(6):602-8.
- Rodin VB, Jigletsova SK, Akimova NA, Kholodenko VP. Direct quantitative evaluation of the effects of biocides on *pseudomonas fluorescens* in various nutrient media. Appl Biochem Microbiol. 2000;36(6):609-12.
- Javed MA, Stoddart PR, McArthur SL, Wade SA, Palombo EA. Inhibition or acceleration: bacterial test media can determine the course of microbiologically influenced corrosion. Corr Sci. 2014;86:149-58.
- Valencia-Cantero E, Peña-Cabrales JJ. Effects of iron-reducing bacteria on carbon steel corrosion induced by thermophilic sulfate-reducing consortia. J Microbiol Biotechnol. 2014;24(2):280-6.
- Rodin VB, Zhigletsova SK, Zhirkova NA, Aleksandrova NV, Chugunov VA, Kholodenko VP. Corrosive activity of natural microbial associations at various conditions of cultivation. Applied Biochemistry and Microbiology. 2011;47(6):615-620.
- Laitinen GA, Kharris VE. Khimicheskii analiz [Chemical analysis]. Moscow: "Khimiya" Publ., 1979, 624 p. (In Russian).
- King RA, Miller JDA. Corrosion by the sulphate-reducing bacteria. Nature. 1971;233:491-2.

---

### Информация об авторах:

Родин Владимир Борисович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 1432279, Оболенск, Московская область, Серпуховской р-н, ГНЦПМБ  
 Телефон: (4967) 36-0000; (4967) 36-0010  
 E-mail: info@obolensk.org

Акимова Наталья Александровна, ведущий инженер-микробиолог сектора разработки диагностических препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 1432279, Оболенск, Московская область, Серпуховской р-н, ГНЦПМБ  
 Телефон: (4967) 31-1983  
 E-mail: Ana101@mail.ru

Холоденко Василий Петрович, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Пушинский государственный естественно-научный институт»  
 Адрес: 142290, Пушино, пр. Науки, 3  
 Телефон: (4967) 73-18-57  
 E-mail: kholodenko\_srcam@mail.ru

## References

- Videla HA. Manual of Biocorrosion. N.-Y.: CRC Press Inc., 1996, 273 p.
- Borenshtein SW. Microbiologically influenced corrosion handbook. N.-Y.: Industrial Press Inc., 1994, 208 p.
- Pedersen A, Hermansson M. The effects on metal corrosion by *Serratia marcescens* and a *Pseudomonas* sp S9. Biofouling. 1989;1:313-22.
- Jayaraman A, Eartman JC, Wood TK. Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel. Appl Microbiol Biotechnol. 1997;47(1):62-8.
- Potekhina JS, Sherisheva NG, Potekhina LP, Pospelov AP, Rakitina TA, Warnecke F, et al. Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats. Appl Microbiol Biotechnol. 1999;52(5):639-46.
- Rodin VB, Jigletsova SK, Kobelev VS, Akimova NA, Aleksandrova NV, Rasulova GE, et al. Development of biological methods for controlling the aerobic

---

### Information about authors:

Vladimir B. Rodin, senior researcher, PhD, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0000; (4967) 36-0010  
 E-mail: info@obolensk.org

Natalia A. Akimova, leading engineer-microbiologist sector development of diagnostic products, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 31-1938  
 E-mail: Ana101@mail.ru

Vasily P. Kholodenko, Sc.D., professor Pushchino State Natural Science Institute  
 Address: 3, pr. Nauki, Pushchino, 142290, Russian Federation  
 Phone: (4967) 73-18-57  
 E-mail: kholodenko\_srcam@mail.ru

# Оценка лечебно-профилактической эффективности бактериофага *Klebsiella pneumoniae* vB\_KpnP\_KpV289 на модели острого сепсиса у мышей

А.И.Борзилов, В.П.Мякина, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова,  
В.М.Красильникова, В.В.Веревкин, Н.В.Воложанцев

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

На лабораторной модели клебсиеллезной септической инфекции у мышей изучена лечебно-профилактическая эффективность бактериофага vB\_KpnP\_KpV289. Показано, что однократное внутрибрюшинное введение  $10^9$  бляшкообразующих единиц (БОЕ) бактериофага за час или через час после инфицирования культурой вирулентного штамма *Klebsiella pneumoniae* в дозе 250 LD<sub>50</sub> приводит к 100% выживанию животных с полной элиминацией бактериальной культуры (при 100% гибели животных в контрольной группе, не получавших бактериофаг). Аналогичный эффект наблюдался при начале лечения через 12 ч ( $10^9$  БОЕ, дважды в сутки в течение 5 дней). При начале фаготерапии через 24 ч после инфицирования выживаемость животных составляла от 50 до 80% (при разных схемах лечения).

**Ключевые слова:** *Klebsiella pneumoniae*, бактериофаг, фаготерапия

**Для цитирования:** Борзилов А.И., Мякина В.П., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Красильникова В.М., Веревкин В.В., Воложанцев Н.В. Оценка лечебно-профилактической эффективности бактериофага *Klebsiella pneumoniae* vB\_KpnP\_KpV289 на модели острого сепсиса у мышей. Бактериология. 2017; 2(1): 73–77. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-73-77

## Evaluation of preventive and therapeutic efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB\_KpnP\_KpV289 on the model of acute sepsis in mice

A.I.Borzirov, V.P.Myakinina, O.V.Korobova, T.I.Kombarova,  
V.M.Krasilnikova, V.V.Verevkin, N.V.Volozhantsev

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

The preventive and therapeutic efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB\_KpnP\_KpV289 was studied by using of the model of acute sepsis in mice. It is shown that a single intraperitoneal injection of  $10^9$  phage forming units (pfu) of bacteriophage an hour before or an hour after infection with the virulent *Klebsiella pneumoniae* strain (dose 250 LD<sub>50</sub>) provides the survival of the animals in 100% of cases with complete elimination of the bacterial culture. At the same time, all mice in the control group (not treated with bacteriophage) died. A similar effect is observed in the phage therapy initiated 12 hours after *K. pneumoniae* infection ( $10^9$  pfu, twice a day for 5 days). In therapy delayed for 24 hours the survival rate of animals ranged from 50 to 80% at different treatment scheme.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, bacteriophage, phage therapy

**For citation:** Borzirov A.I., Myakinina V.P., Korobova O.V., Kombarova T.I., Krasilnikova V.M., Verevkin V.V., Volozhantsev N.V. Evaluation of preventive and therapeutic efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB\_KpnP\_KpV289 on the model of acute sepsis in mice. Bacteriology. 2017; 2(1): 73–77. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-73-77

**K** *lebsiella pneumoniae* – вид грамотрицательных факультативно-анаэробных условно-патогенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Благодаря устойчивости к различным классам антибиотиков, этот микроорганизм быстро

распространяется в стационарах лечебных учреждений и становится одним из основных агентов, вызывающих внутрибольничные пневмонии, сепсис, инфекции мочевыводящих путей [1]. В последние годы появились особенно опас-

### Для корреспонденции:

Воложанцев Николай Валентинович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной диагностики и гено-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147

E-mail: nikvol@obolensk.org

Статья поступила 30.11.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

### For correspondence:

Nikolay V. Volozhantsev, PhD (Biol.), Head of Laboratory of Molecular Diagnostics and Genetic Engineering Preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB, Obolensk, 142279, Russia

Phone: +7 (4967) 36-0147

E-mail: nikvol@obolensk.org

The article was received 30.11.2016, accepted for publication 15.03.2017

ные множественно устойчивые варианты *K. pneumoniae* (МЛУ), несущие новую карбапенемазу New Delhi – суперфермент, обеспечивающий устойчивость микроба к современным бета-лактамам, а также факторы резистентности к фторхинолонам и аминогликозидам [2]. С середины 1980-х гг. стали появляться сообщения о выделении новых высоковирулентных (гипермукоидных) вариантов *K. pneumoniae* (hvKp), которые в отличие от «классических» (сKp) вызывают как госпитальные, так и внегоспитальные инфекции с характерным формированием первичных гнойных абсцессов печени с последующим метастазированием и развитием у больных менингитов, пневмоний, эндофтальмитов, инфекций мягких тканей и мочевыводящих путей [3, 4]. Клебсиеллы этого типа характеризуются наличием у них не только факторов резистентности к современным антибиотикам, но и большим набором детерминант вирулентности по сравнению с сKp [4]. В случае приобретения hvKp-клебсиеллами экстремальной (XDR) или пан-устойчивости (PDR) к антимикробным препаратам данный гипервирулентный патоген может приобрести еще большую опасность, превратившись в «суперпатоген».

В связи с этим чрезвычайно актуальной является проблема поиска и разработки новых средств против инфекций, вызванных *Klebsiella pneumoniae*. Одним из таких средств могут быть бактериофаги, хорошо зарекомендовавшие себя при лечении инфекционных заболеваний в различных областях медицины: в хирургии [5, 6], урологии [7], стоматологии [8], при лечении больных с ожоговой травмой [9], кожных язв [10] и других инфекционных патологий [11].

**Целью настоящего исследования** является изучение лечебно-профилактической эффективности бактериофага vB\_KpnP\_KpV289 на модели летальной клебсиеллезной инфекции у мышей.

## Материалы и методы

### Лабораторные животные

В экспериментах использовали белых аутбредных (беспородных) мышей (самцы/самки, 19–26 г), полученных из питомника лабораторных животных «Андреевка» ФГБУН

НЦБМТ ФМБА. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями. Мыши размещались в поликарбонатных клетках (Lab Products Inc., США) группами не более пяти в каждой, имели свободный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм», Москва). Умерших в процессе эксперимента мышей удаляли из клеток незамедлительно.

### Культуры бактерий и бактериофага

Для получения препаратов бактериофагов и инфицирования лабораторных животных использовали культуру штамма *K. pneumoniae* KPM9 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» (Инв. № В-7749). Штамм KPM9 обладает гипермукоидным фенотипом и высокой вирулентностью для лабораторных животных. Летальная доза LD50 штамма при подкожном заражении мышей составляет 40 колониеобразующих единиц (КОЕ).

Фаголизаты получали при инфицировании бактерий *K. pneumoniae* KPM9 бактериофагом vB\_KpnP\_KpV289, далее KpV289 (№ Ph-94 в «ГКПМ-Оболensk»). Бактериальную культуру, выращенную в жидкой питательной среде до концентрации 10<sup>9</sup> КОЕ/мл, разводили в 5 раз той же средой, содержащей 10 mM MgSO<sub>4</sub>, и заражали бактериофагом с множественностью инфицирования 0,01–0,1 БОЕ/КОЕ. Смесь инкубировали при температуре 37°C при аэрации (качалка, 170 об/мин) до просветления культуры. Фаголизат стерилизовали добавлением 1% хлороформа с последующим интенсивным перемешиванием в течение 20 минут. Клеточный дебрис удаляли низкоскоростным центрифугированием (10 000 об/мин, 10 мин), надосадочную жидкость отбирали в стерильную емкость. Количество фаговых частиц в фаголизате определяли методом Грациа.

### Моделирование летальной клебсиеллезной инфекции

Острую летальную форму клебсиеллезной инфекции воспроизводили при подкожном заражении мышей культурой *K. pneumoniae* KPM9 в дозе ~1 × 10<sup>4</sup> КОЕ (250 LD<sub>50</sub>) в объеме 0,5 мл. Бактериальную суспензию для инфициро-

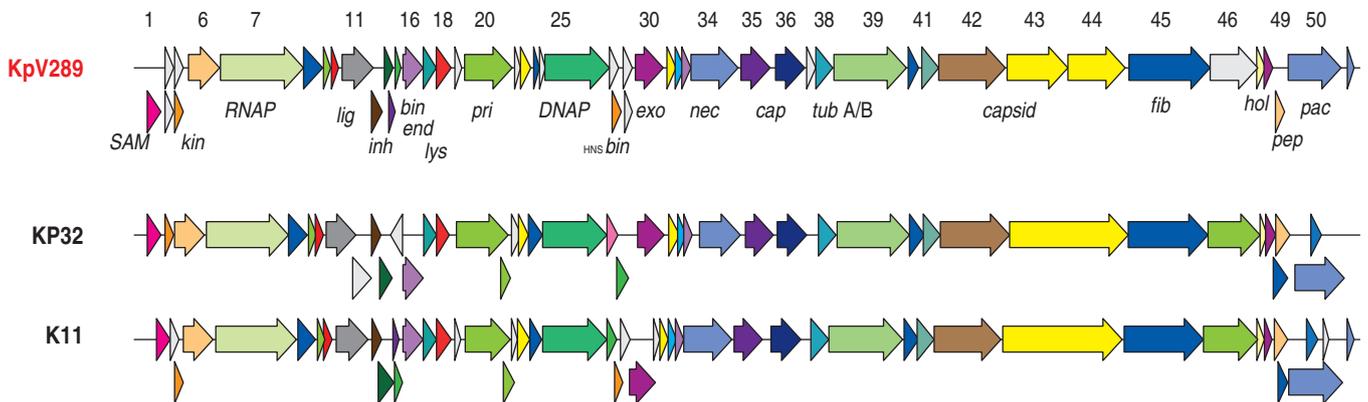


Рис. 1. Геномы бактериофага KpV289 и близкородственных фагов KP32 и K11. Обозначены гены с предполагаемыми функциями: SAM, S-аденозил-L-метионин гидролаза; kin, протеин киназа; RNAP, РНК-полимераза; lig, ДНК-лигаза; inh, ингибитор бактериальной РНК-полимеразы; bin, ssДНК-связывающий протеин; end, эндонуклеаза; lys, лизин (N-ацетилмурамоил-L-аланин амидаза); pri, праймаза/хеликаза; DNAP, ДНК-полимераза; HNS bin, HNS связывающий протеин; exo, экзонуклеаза; nec, коннектор joining protein; cap, белки капсида; tub A, тубулярный хвостовой белок А; tub B, тубулярный хвостовой белок В; cor, внутренний (коровый) протеин; fib, хвостовые фибры; hol, холин; pac, ДНК упаковывающий протеин, pep, эндопептидаза. Гены, кодирующие продукты с похожими свойствами, окрашены одним цветом.

вания животных готовили из суточной агаровой культуры *K. pneumoniae*, суспендированной в физиологическом растворе до мутности, эквивалентной 0,5 по стандарту МакФарланда, что соответствует  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл, и титровали до конечной концентрации  $2 \times 10^4$  КОЕ/мл. Контроль количества клеток во взвеси осуществляли путем посева по 0,1 мл из соответствующих разведений приготовленной суспензии на плотную питательную среду № 1 ГРМ (ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посевы инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C.

## Результаты и обсуждение

Бактериофаг КрV289, использованный в экспериментах по фаготерапии острой клебсиеллезной инфекции у мышей, является вирусом с литическим (вирулентным) типом взаимодействия с бактериальной клеткой. По морфологическим и молекулярно-генетическим свойствам, опубликованным ранее [12], этот фаг относится к семейству *Podoviridae*, подсемейству *Autographivirinae*, роду *T7 virus*. Бактериофаг лизирует около 11% штаммов *K. pneumoniae* (15 из 140 штаммов лабораторной коллекции) разных капсульных типов с формированием на газонах чувствительных культур прозрачных негативных колоний с ореолом. Наличие ореолов вокруг негативных колоний может свидетельствовать о продукции бактериофагом растворимого фермента, подобного полисахарид-деполимеразам, способного расщеплять полисахариды бактериальной капсулы [12]. Полисахарид-деполимеразная активность является важным признаком при отборе бактериофагов, лизирующих гипермукоидные штаммы *K. pneumoniae*.

Определена полная нуклеотидная последовательность генома бактериофага КрV289 (GenBank: LN866626) с характерной для большинства фагов, содержащих двухцепочечную ДНК, модульной архитектурой генома. На рисунке 1 представлены геномы бактериофага КрV289 и наиболее близких гомологов – бактериофагов КР32 и К11, аннотированных и депонированных в базе данных GenBank (NC\_013647 и NC\_011043 соответственно).

В геноме бактериофага КрV289 не выявлено генов, детерминирующих синтез токсинов или каких-либо других факторов вирулентности, генов, связанных с устойчивостью к антибиотикам, а также генов, определяющих умеренный тип развития бактериофага.

Лечебно-профилактическую эффективность бактериофага КрV289 при острой клебсиеллезной инфекции у мышей изучали на шести экспериментальных и двух контрольных группах животных, каждая из которых включала 10 особей. Животным опытных групп препарат фага вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл (около  $1 \times 10^9$  БОЕ): первой группе – однократно за 1 ч до инфицирования культурой штамма КРМ9, второй группе – через 1 ч после инфицирования (однократно). Животным 3-й, 4-й и 5-й групп бактериофаг вводили через 1, 12 и 24 ч после инфицирования соответственно, дважды в сутки в течение 5 дней. Мышам 6-й группы бактериофаг вводили через 24 ч после инфицирования дважды в сутки в течение 5 дней внутрибрюшинно, затем три дня 1 раз в день в место инфицирования. Схема эксперимента представлена на рисунке 2.

Первую контрольную группу животных бактериофагами не обрабатывали, но заражали в той же дозе, что и опытных мышей (контроль заражения). На второй контрольной группе мышей определяли токсичность препарата бактериофага, который вводили животным однократно внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. За мышами опытных и контрольных групп, инфицированными вирулентным штаммом *K. pneumoniae* КРМ9, наблюдали во время всего курса фаготерапии и в течение 14 дней после окончания лечения, регистрируя гибель и изменения в поведении животных, состоянии их шерстного покрова и аппетита. В конце эксперимента выживших животных эвтаназировали, вскрывали и проводили бактериологический анализ образцов крови, селезенки, легких и печени с целью выявления клеток штамма *K. pneumoniae*.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о высокой лечебно-профилактической эффективности бактериофага КрV289 (рис. 3). Однократное внутрибрюшинное введение  $1 \times 10^9$  БОЕ фага за 1 ч до инфицирования или через 1 ч после инфицирования мышей культурой штамма *K. pneumoniae* КРМ9 защищало от гибели 100% животных (группы №1 и №2, рис. 3). Фаготерапия, проведенная через 12 ч после инфицирования (группа мышей №4), также

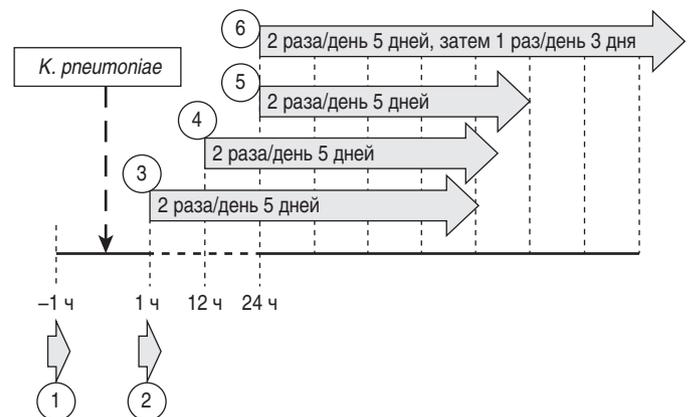


Рис. 2. Схема эксперимента по оценке лечебно-профилактической эффективности бактериофага КрV289.

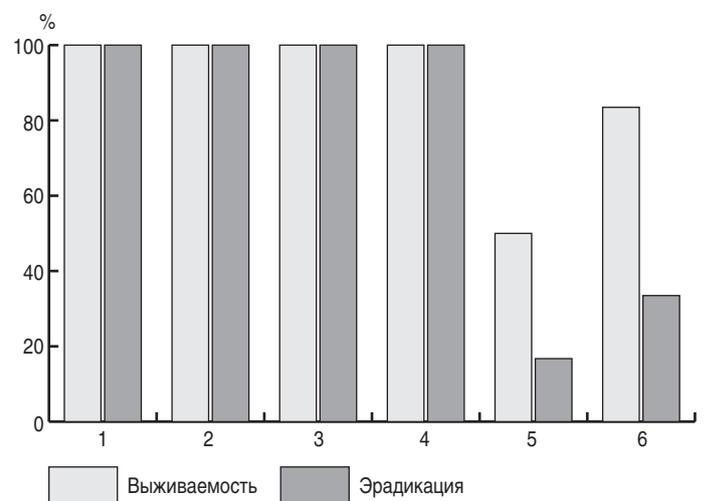


Рис. 3. Профилактическая и лечебная эффективность бактериофага КрV289. Номер группы животных соответствует номеру на рис. 2.

давала положительный результат: все животные выжили. Следует отметить, что ни из крови, ни из паренхиматозных органов (селезенка, легкие, печень) выживших животных из групп №№ 1–4 культура штамма *K. pneumoniae* KPM9 не выделялась, что свидетельствует о полной эрадикации возбудителя из организма животных. В то же время все инфицированные мыши, не получавшие бактериофаг (контрольная группа), погибли в течение семи суток, в том числе 80% – на 2–3-е сутки после заражения. У всех погибших в контрольной группе животных была выделена культура *K. pneumoniae* KPM9, чувствительная к бактериофагу КрV289.

При более поздних сроках начала применения бактериофага (через 24 ч после заражения) эффективность терапии клебсиеллеза у мышей снижается. Выживаемость животных в группе №5 составила 50% (5 из 10 мышей погибли). Среди выживших животных в этой группе количество санированных мышей составило 40%. Следует отметить, что в группе №6 выживаемость мышей составила 80%. Очевидно, в этом случае более выраженный терапевтический эффект связан с тем, что мышам группы №6, в отличие от группы №5, через 5 дней лечения была проведена в течение трех дней дополнительная обработка бактериофагом места инфицирования, где в большинстве случаев наблюдали формирование абсцессов с выделением культуры *K. pneumoniae*.

У выживших мышей из экспериментальных групп, а также у неинфицированных мышей второй контрольной группы, получавших бактериофаг, в течение всего срока наблюдения признаков инфекционного заболевания или интоксикации не отмечали. Животные не теряли в весе и имели нормальный аппетит, шерстистый покров оставался гладким и блестящим, поведение было адекватным для данного вида животных.

Все погибшие животные имели симптомы острого септического заболевания: угнетенность поведения, снижение или отсутствие аппетита, взъерошенность шерстистого покрова, диарею, а также характерный признак инфекции, обусловленной штаммом *K. pneumoniae* KPM9, – обширный отек в месте введения бактериальной культуры.

### Заключение

На примере летальной клебсиеллезной инфекции у белых беспородных мышей продемонстрирована высокая лечебно-профилактическая эффективность бактериофага vB\_KpnP\_KpV289.

Полученные данные показали, что эффективность фаготерапии экспериментального клебсиеллеза у мышей, вызванного вирулентным гипермукоидным штаммом *K. pneumoniae*, напрямую зависит от сроков начала курса терапии. Более раннее начало лечения (до 12 час после заражения) обеспечивает не только 100% выживаемость мышей, но и способствует полной элиминации возбудителя из органов и тканей животных. На протяжении 14 дней после заражения у этих животных отсутствовали симптомы острой клебсиеллезной инфекции.

Проведенные эксперименты показали, что бактериофаг vB\_KpnP\_KpV289 может быть рекомендован для включения в состав лечебно-профилактических препаратов против

инфекций, вызываемых высоковирулентными штаммами *Klebsiella pneumoniae*.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №15-15-00058)*

### Литература

1. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:589-603.
2. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046-54. DOI: 10.1128/AAC.00774-09
3. Liu YC, Cheng DL, Lin CL. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch Intern Med.* 1986;146:1913-16.
4. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence.* 2013;4:107-18. DOI: 10.4161/viru.22718
5. Лахно ВМ, Бордуновский ВН. Применение фаготерапии в хирургической практике. *Вестник хирургии.* 2001;160(1):122-5.
6. Хайруллин ИН, Поздеев ОК, Шайморданов РШ. Эффективность применения специфических бактериофагов в лечении и профилактике хирургических послеоперационных инфекций. *Казанский медицинский журнал.* 2002;4:258-61.
7. Перепанова ТС, Дарбева ОС. Эффективность препаратов бактериофага при лечении урологических воспалительных заболеваний. *Урология и нефрология.* 1995;5:14-17.
8. Лазарева ЕБ. Бактериофаги для лечения и профилактики инфекционных заболеваний. *Антибиотики и химиотерапия.* 2003;48(1):36-40.
9. Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS ONE.* 2009;4(3):e4944. DOI: 10.1371/journal.pone.0004944
10. Markoishvili K, Tsitlanadze G, Katsarava R, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int J Dermatol.* 2002;41(7):453-58.
11. Aleshkin AV, Volozhantsev NV, Svetoch EA, Afanas'ev SS. Bacteriophages as Probiotics and Decontaminating Agents for Food Product. In: *Bacteriophages: Biology, Applications and Role in Health and Disease* (Eds: Clark Denton and Richard J. Crosby), Nova Science Publishers, NY, 2013; pp. 93-1.
12. Volozhantsev NV, Myakinina VP, Popova AV, Kislichkina AA, Komisarova EV, Knyazeva AI, et al. Complete genome sequence of novel T7-like virus vB\_KpnP\_KpV289 with lytic activity against *Klebsiella pneumoniae*. *Arch Virol.* 2016;161(2):499-501. DOI: 10.1007/s00705-015-2680-z
13. Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology.* 1998;144:3039-47.

### References

1. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:589-603.
2. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase

- gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046-54. DOI: 10.1128/AAC.00774-09
3. Liu YC, Cheng DL, Lin CL. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch Intern Med.* 1986;146:1913-16.
4. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence.* 2013;4:107-18. DOI: 10.4161/viru.22718
5. Lakhno VM, Bordunovskii VN. Primenenie fagoterapii v khirurgicheskoi praktike. *Vestnik khirurgii.* 2001;160(1):122-5. (In Russian).
6. Khairullin IN, Pozdeev OK, Shaimordanov RSh. Efficiency of using specific bacteriophages in the treatment and prophylaxis of surgical postoperative infections. *Kazan Medical Journal.* 2002;4:258-61. (In Russian).
7. Perepanova TS, Darbeeva OS. Effektivnost' preparatov bakteriofaga pri lechenii urologicheskikh vospalitel'nykh zabolevaniy. *Urologiya i nefrologiya.* 1995;5:14-17. (In Russian).
8. Lazareva EB. Bakteriofagi dlya lecheniya i profilaktiki infektsionnykh zabolevaniy. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2003;48(1):36-40. (In Russian).
9. Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS ONE.* 2009;4(3):e4944. DOI: 10.1371/journal.pone.0004944
10. Markoishvili K, Tsitlanadze G, Katsarava R, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int J Dermatol.* 2002;41(7):453-58.
11. Aleshkin AV, Volozhantsev NV, Svetoch EA, Afanas'ev SS. Bacteriophages as Probiotics and Decontaminating Agents for Food Product. In: *Bacteriophages: Biology, Applications and Role in Health and Disease* (Eds: Clark Denton and Richard J. Crosby), Nova Science Publishers, NY, 2013; pp. 93-1.
12. Volozhantsev NV, Myakinina VP, Popova AV, Kislichkina AA, Komisarova EV, Knyazeva AI, et al. Complete genome sequence of novel T7-like virus vB\_KpnP\_KpV289 with lytic activity against *Klebsiella pneumoniae*. *Arch Virol.* 2016;161(2):499-501. DOI: 10.1007/s00705-015-2680-z
13. Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology.* 1998;144:3039-47.
- Мякина Вера Павловна, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 31-2464
- Коробова Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147
- Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147
- Красильникова Валентина Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147
- Веревкин Владимир Васильевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0079

#### Information about authors:

Alexander I. Borzilov, PhD (Med.), Head of Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB, Obolensk, 142279, Russia  
Phone: +7 (4967) 36-0147

Vera P. Myakinina, Researcher of Laboratory of Molecular Diagnostics and Genetic Engineering Preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB, Obolensk, 142279, Russia  
Phone: +7 (4967) 31-2464

Olga V. Korobova, PhD (Biol.), Senior researcher of Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB, Obolensk, 142279, Russia  
Phone: +7 (4967) 36-0147

Tatyana I. Kombarova, PhD (Biol.), Senior researcher of Biological Testing Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB, Obolensk, 142279, Russia  
Phone: +7 (4967) 36-0147

Valentina M. Krasilnikova, PhD (Biol.), Senior Researcher of Laboratory of Molecular Diagnostics and Genetic Engineering Preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB, Obolensk, 142279, Russia  
Phone: (4967) 36-0147

Vladimir V. Verevkin, PhD (Biol.), Senior Researcher of Laboratory of Molecular Diagnostics and Genetic Engineering Preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB, Obolensk, 142279, Russia  
Phone: (4967) 36-0079

#### Информация о авторах:

Борзилов Александр Иосифович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область, ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0147

#### Клиническая микробиология, Второе издание

by J. Keith Struthers

ISBN-13: 9781498786898

ISBN-10: 1498786898

Publisher: CRC Press

Publish Date: February 2017

Page Count: 182

Эта книга – введение в основы медицинской микробиологии и клинической практики. Помимо бактериологических аспектов, в ней рассмотрены вопросы вирусологии и паразитологии. Второе издание касается основ микробной инфекции и, по-прежнему, является основой для развития логической и диагностической стратегии, в том числе в области применения антибиотиков. Раздел I посвящен клиническим вопросам инфекций органов, в то время как полный анализ научных аспектов, лежащих в основе бактериальных инфекций, представлен в разделе II.

# Правила оформления статей (основные положения)

Журнал «Бактериология» публикуется на русском языке (резюме статей и ключевые слова – на русском и английском языках), распространяется на бумажном носителе и публикуется в электронной форме.

К публикации принимаются экспериментальные и обзорные статьи, а также короткие сообщения по прикладным и фундаментальным вопросам медицинской, ветеринарной и сельскохозяйственной бактериологии. Статьи принимаются без ограничения объема от граждан любой страны на русском языке. По согласованию с редакцией допускается публикация рекламных материалов, соответствующих тематике журнала.

Публикации, созданные в порядке выполнения служебного задания, должны иметь направление от учреждения, в котором выполнена работа. В направлении следует указать, что представленный материал ранее не был нигде опубликован и не находится на рассмотрении для публикации в других изданиях (включая зарубежные).

К публикации прилагается экспертное заключение организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов.

Материалы для публикации, включая сопровождающие документы, направляются в редакцию в электронной форме по адресу: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org) или [bacteriology@obolensk.org](mailto:bacteriology@obolensk.org). В теме сообщения следует указать «Бактериология».

## Требования к оформлению статьи.

*Экспериментальная статья* должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

*Краткие сообщения* представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторах на русском и английском языках с указанием адреса, контактных телефонов (служебного и мобильного), факса и электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

### НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов\*, П. П. Петров\*\*

\*Первая организация, г. Москва, РФ

\*\*Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

Текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок – отдельным файлом.

РЕЗЮМЕ статьи должно быть представлено на русском и английском языках, отражать основные полученные результаты и содержать не более 250 слов.

КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (словосочетаний) должно быть не более 10, на русском и английском языках.

Во ВВЕДЕНИИ (без заголовка) следует изложить мотивацию написания данной работы и отдельным абзацем обозначить цель исследования. Дополнительно на английском языке.

Раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ должен содержать сведения об объекте исследования (включая источник получения, название коллекции) и краткое описание использованных методик, позволяющее их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала в кавычках и страны в скобках.

Следует использовать общепринятые современные сокращения мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. Единицы измерения должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная). Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов следует приводить в соответствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используют строчные буквы (курсив).

Рисунки и таблицы размещаются в тексте статьи в соответствии с пожеланиями авторов. Кроме того, черно-белые и цветные рисунки (в формате \*.jpg) прилагаются к статье в виде отдельных файлов (ris1.jpg, ris2.jpg и т.д.)

Сведения о финансовой поддержке работы приводятся в конце текста статьи перед списком литературы.

В СПИСКЕ ЛИТЕРАТУРЫ указываются авторы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для названия журналов используются общепринятые сокращения (<http://www.nlm.nih.gov/>).

В случае невыполнения настоящих правил оформления статья не принимается и отсылается авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

**Статьи направлять по адресу:**

**142279, Московская обл.,**

**Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ**

**Тел. (4967) 36-00-46**

**Факс (4967) 36-00-10**

**E-mail: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org)**

**или**

**[bacteriology@obolensk.org](mailto:bacteriology@obolensk.org)**