

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии  
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

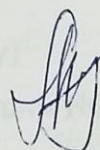
*На правах рукописи*

Янтурина Ирина Альбертовна

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА *TOXA* ЭКЗОТОКСИНА *PSEUDOMONAS*  
*AERUGINOSA* И ГЕНА *PMEN\_4277* СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ *MVIN*  
*PSEUDOMONAS MENDOCINA*

Научный руководитель:

доктор медицинских (биологических) наук,  
профессор



А.Р. Мавзютов

Уфа – 2018

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Распространение	9
1.2. Этиологическое значение	10
1.2.1. Этиологическое значение <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.2.2. Этиологическое значение <i>Pseudomonas mendocina</i>	14
1.3. Морфологические свойства	16
1.4. Культуральные свойства	16
1.5. Продукция факторов патогенности	18
1.5.1. Продукция факторов патогенности <i>P. aeruginosa</i>	18
1.5.2. Продукция факторов патогенности <i>P. mendocina</i>	29
1.6. MALDI-TOF масс-спектрометрия	31
1.7. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	33
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1. Общая характеристика материала и методов исследования	35
2.2. Бактериологическое исследование	36
2.2.1. Подготовка лабораторной посуды к стерилизации	36
2.2.2. Освоение техники посева клинического материала	37
2.2.3. Посев образцов клинического материала	39
2.2.4. Биохимические особенности неферментирующих грамотрицательных бактерий	40
2.3. Микроскопия мазка (окраска по Граму)	41
2.4. Идентификация микроорганизмов группы НФГОб методом масс-спектрометрии	42
2.5. Поиск и сравнительный анализ последовательностей ДНК-мишеней	45
2.6. Выделение ДНК неферментирующих грамотрицательных	46

бактерий	
2.7.	Определение чувствительности и специфичности подобранных последовательностей ДНК-мишеней 48
2.8.	ПЦР генов патогенности неферментирующих грамотрицательных бактерий 50
2.9.	Детекция продуктов ПЦР-амплификации методом агарозного гель-электрофореза 53
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 55	
3.1.	Выделение клинических штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий 55
3.2.	Бактериологический посев 57
3.3.	Микроскопия мазка (окраска по Граму) 59
3.4.	Идентификация микроорганизмов группы НФГОб на MALDI-TOF масс-спектрометре 60
3.5.	Определение антибиотикорезистентности неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов 61
3.5.1.	Антибиотикорезистентность штаммов <i>P. aeruginosa</i> 61
3.5.2.	Антибиотикорезистентность штаммов <i>P. mendocina</i> 63
3.6.	Определение специфичности и чувствительности праймера PsAerug21 63
3.6.1.	Определение специфичности 63
3.6.2.	Определение чувствительности 64
3.7.	Детекция результатов амплификации гена <i>toxA</i> в геноме штаммов <i>P. aeruginosa</i> 66
3.8.	Определение специфичности и чувствительности праймера PsMen22 66
3.8.1.	Определение специфичности 66
3.8.2.	Определение чувствительности 67
3.9.	Детекция результатов амплификации гена <i>rmen_4277</i> в 69

геноме штаммов *P. mendocina*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	70
ВЫВОДЫ	74
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	75
Приложение 1	90
Приложение 2	91
Приложение 3	93

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ВБИ – внутрибольничная инфекция

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

НФГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии

ОРИТ - отделение реанимации и интенсивной терапии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

MALDI-TOF MS - времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Особенностью современного этапа развития инфекций является увеличение в их структуре числа заболеваний, вызываемых многочисленными представителями группы грамотрицательных неферментирующих условно-патогенных бактерий. Исследование более 700 клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов, выделенных из образцов отделяемого ран, мокроты и мочи пациентов, показало, что на долю всех случаев выделения неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФГОб) приходится 4,45% в 2009 году, 5,5% в 2010 году и 6,7% в 2011 году (Shaver, Hauser, 2004). Стоит отметить, что наиболее часто неферментирующие грамотрицательные бактерии выявлялись при инфекциях нижних дыхательных путей в 7,1% и при гнойно-септических процессах в 5,1% (Мавзютов и др., 2012). По результатам клинических исследований отечественных ученых было установлено, что 52,3% выделенных штаммов относились к грамотрицательной микрофлоре, удельный вес неферментирующих грамотрицательных бактерий составил 34,4% изучаемых штаммов, среди которых *Pseudomonas aeruginosa* составила 13,4% высеянных культур (Бисенова и др., 2016).

Актуальность проблемы ранней диагностики инфекционных заболеваний, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями, обуславливается тем, что бактериальные инфекции при задержке адекватной антибиотикотерапии сопровождаются тяжелыми осложнениями у гематологических больных, пациентов отделений интенсивной терапии, а также у лиц, подвергающихся воздействию неблагоприятных экологических и производственных факторов (Чучалин и др., 2005). Защитные механизмы бактерий рода *Pseudomonas* позволили сохранить маркеры устойчивости к антибиотикам, деградирующие

ферменты и системы секреции, которые влияют на инфекцию человека (Frank, 2012).

*Pseudomonas aeruginosa* является высоковирулентным возбудителем поздних вентиляционных пневмоний, инфекций мочевыводящих путей, катетер-ассоциированных ангиогенных инфекций, бактериемии, раневых инфекций, инфекций глаз, ожоговых ран (Delden, Iglewski, 2007). Встречаемость *P. aeruginosa* среди других неферментирующих грамотрицательных возбудителей инфекционных осложнений с годами увеличивается с 11,2% в 1998 г. (Руднов, Зубарев, 2008) до 28,2% в 2012 г. (Хасанова и др., 2012). *P. aeruginosa* может поражать различные органы и ткани, отмечается, инфицирование жизненно важных органов (легких, сердца) посредством сепсиса кровотока приводит к летальному исходу в 25% случаев (Руднов, 2008).

Опираясь на тот факт, что род *Pseudomonas* включает виды, имеющие большое этиологическое значение в медицине, можно предположить, что и другие, менее известные, представители рода способны вызывать различные инфекционные заболевания макроорганизма. *Pseudomonas mendocina* редко встречается в медицинской практике, тем не менее, в литературе описаны случаи, в которых бактерия являлась причиной инфицирования эндокардита (Omote, et al, 2006).

### **Цель исследования**

Подтвердить эффективность использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas mendocina* и метода молекулярной генетики (классической ПЦР) для обнаружения генов патогенности.

### **Задачи исследования**

1. Выделение чистой культуры НФГОБ;
2. Проведение идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии;
3. Подбор видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров;

4. Проведение ПЦР анализа стандартным методом с последующей детекцией результатов;

5. Оценка диагностической ценности исследования.

### **Научная новизна и теоретическая ценность работы**

Впервые для определения этиологической значимости возбудителя заболевания был объединен метод ускоренной идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и определение факторов патогенности микроорганизма молекулярно-генетическим методом с использованием видоспецифичных праймеров.

### **Научно-практическая значимость**

Внедрение результатов исследования в клиническую практику позволит врачам не только ставить точный диагноз, но и предотвращать возможные осложнения различных заболеваний, вызванных неферментирующими грамотрицательными микроорганизмами. Идентификация возбудителей бактериальных инфекций, вызванных НФГОБ, методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и обнаружение патогенных генов НФГОБ молекулярно-генетическим методом ПЦР может стать основой для ранней диагностики, назначения адекватной антибиотикотерапии, мониторинга и прогнозирования течения бактериальных инфекций.



# ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Распространение

Представители рода *Pseudomonas* широко распространены в природе, что обусловлено способностью свободноживущих бактерий использовать в качестве источника энергии различные природные органические соединения. Псевдомонады занимают различные экологические ниши: их обнаруживают в почве, воде, отбросах, на поверхности кожи человека и теплокровных животных, на растениях.

Метаболические возможности позволяют *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas mendocina* колонизировать места обитания, принципиально отличающиеся по физико-химическому составу, термодинамическому режиму и биологической организации.

Существенно повышает устойчивость бактерий во внешней среде экзополисахарид (гликокаликс), защищающий *P. aeruginosa* и *P. mendocina* от бактериофагов и поверхностно-активных веществ. Кроме того, механизм осмоадаптации позволяет микробам сохранять жизнеспособность в среде с высокой концентрацией солей. Использование феноловых и четвертичных аммониевых соединений в качестве факторов роста даёт возможность *P. aeruginosa* поддерживать жизнеспособность в растворах дезинфицирующих средств.

Бактерии могут существовать в форме хемолитотрофа (размножаться в ограниченных минеральных средах), сапрофита (в пищевых продуктах и сточных жидкостях), симбионта (при дисбактериозе), комменсала (при носительстве) и проявить себя в качестве завершённого патогена.

Адаптационные генетико-биохимические механизмы бактерий группы НФГОБ в природной и искусственной среде обитания не идентичны. Сочетание влажного субстрата и температуры ниже +20°C влечет за собой массивное накопление биомассы бактерий рода *Pseudomonas*. При резкой смене температуры и среды обитания с

сапрофитной на паразитарную, создается стрессовая ситуация, усиливающая гетерогенность популяции, что увеличивает потенциальную возможность освоения новой экологической ниши.

*Pseudomonas aeruginosa* – типичный представитель рода *Pseudomonas*, распространена повсеместно. Условно-патогенная палочка входит в состав нормальной микрофлоры человека и способна вызвать инфекционный процесс только при попадании во внутреннюю среду макроорганизма. *Pseudomonas mendocina* также является представителем транзитной микрофлоры кожных покровов человека, но выделяется исследователями крайне редко. Представители НФГОБ способны колонизировать различные госпитальные ниши, включая медицинское оборудование, и циркулировать среди персонала и пациентов, чем представляют большую этиологическую опасность (Donlan, 2001).

## 1.2. Этиологическое значение

### 1.2.1. Этиологическое значение *Pseudomonas aeruginosa*

Род *Pseudomonas* (семейство *Pseudomonadaceae*, порядок *Pseudomonadales*, класс *Proteobacteria*) включает много видов, из которых лишь ограниченный круг представляет интерес для клинической практики (Смирнов, 1990).

Так, *Pseudomonas aeruginosa* представляет один из самых патогенных представителей рода. Широкое распространение и этиологическая значимость бактерии обусловлена широким спектром синтезируемых продуктов метаболизма и способностью циркулировать в различных экологических ареалах, к числу которых относят сточные воды и почвенные массивы. *P. aeruginosa* является представителем нормальной флоры человека, часто колонизирует различные участки тела. Бактерия присутствует на кожных покровах (до 2%), слизистой носа (до 3,3%), в

ротоглотке (6,6%), в желудочно-кишечном тракте (до 24%) (Morrison, Wenzel, 1984).

*P. aeruginosa* относят к группе условно-патогенных микроорганизмов, так как в естественных условиях грамотрицательная палочка не во всех случаях является источником развития инфекции. Для инвазии и возникновения инфекционного процесса необходимо повреждение кожных покровов или слизистых оболочек и проникновение возбудителя во внутреннюю среду макроорганизма. Вероятность возникновения инфекции значительно повышается у людей с иммунной недостаточностью, на фоне влияния различных стрессовых факторов, при сопровождении травм, хирургических вмешательств и тяжелой соматической патологии (Зубков, 2008). Так инфицированность *Pseudomonas aeruginosa* занимает ведущую позицию в этиологии бактериемии при первичных и вторичных (ВИЧ-инфекция) иммунодефицитах, при различных опухолевых процессах организма (Joo, 2011).

*Pseudomonas aeruginosa* вызывает у человека различные инфекционные заболевания: от поверхностной кожной инфекции до острых инфекций мочевыводящих путей или дыхательных путей, сопровождающиеся бактериемией или сепсисом. Также зачастую именно *P. aeruginosa* становится причиной инфекционных процессов в тканях при сильных ожогах и ранах.

Инфекции, обусловленные патогенностью неферментирующих грамотрицательных бактерий, возникают чаще у госпитализированных пациентов (Козлов, 2000). Результаты исследований зарубежных специалистов свидетельствуют о том, что до 30% случаев внутрибольничной инфекции в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) вызваны *Pseudomonas aeruginosa* (Bertrand, Dowzicky, 2012). Частота выделения бактерии в ОРИТ России по данным национального исследования составила 29,9% (Руднов, 2005).

*P. aeruginosa* составляет 51,7% всех респираторных культур, вызывающие продолжительные легочные персистирующие инфекции, которые могут приводить к необратимому повреждению легких. Синегнойная инфекция в органах дыхания развивается у пациентов с хроническими заболеваниями бронхолегочной системы, такими как бронхит, бронхоэктатическая болезнь, муковисцидоз (Guan, et al, 2007). У детей, страдающих муковисцидозом (поражение экзокринных желез с сопутствующими расстройствами функций органов дыхания, пищеварительной системы, поджелудочной железы и печени), *P. aeruginosa* является основным возбудителем легочных осложнений в составе ассоциаций с другими неферментирующими грамотрицательными микроорганизмами, к числу которых относят *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii* (Шагинян, Чернуха, 2005). Исследования группы отечественных ученых показали, что риск развития нозокомиальной пневмонии у пациентов с колонизацией верхних дыхательных путей *P. aeruginosa* в совокупности с другими неферментирующими бактериями возрастает в 10 раз по сравнению с лицами без заселения ротоглотки данными микроорганизмами (Чучалин и др., 2010).

В настоящее время на территории Российской Федерации встречаемость *Pseudomonas aeruginosa* среди возбудителей нозокомиальных пневмоний в зависимости от региональных особенностей варьирует в широких пределах от 20 до 35% (Goel, et al, 2012). Результаты исследования динамики инфекционных заболеваний, вызванных *P. aeruginosa*, показали снижение частоты выделения патогенной палочки у пациентов с внутрибольничной инфекцией с 39,5% до 19% (Гельфанд, 2003). Мониторинг по случаям летальных исходов в отделениях ОРИТ при нозокомиальных пневмониях, возбудителем которых была определена *P. aeruginosa*, зарегистрировал высокий показатель смертности (70%) среди других представителей

неферментирующих грамотрицательных бактерий (Чучалин и др., 2005), (Решедько и др., 2006).

Группа отечественных исследователей, зарегистрировавших результаты 30-летних наблюдений в ожоговом центре Института хирургии им. А.В. Вишневского РАМН, доказала ведущую *Pseudomonas aeruginosa* роль в этиологии инфекционных осложнений термических ран (Крутиков, Бобровников, 2002).

*P. aeruginosa* крайне редко выделяется из половых путей здоровых женщин. Обнаружение представителей микроорганизмов группы НФГОБ в женских половых органах указывает на наличие патологического процесса (Подзолкова, Бархина, 2003). По результатам исследований зарубежных ученых, зачастую именно *Pseudomonas aeruginosa* становится причиной возникновения эндометрита (послеродового), гинекологического и акушерского сепсиса (Karonis, et al, 2013).

Прогноз заболевания существенно ухудшается при возникновении осложнений, связанных бактериемией, возникающих вследствие локализации первичного очага инфекции, вызванного представителем грамотрицательной флоры, в том числе и *P. aeruginosa*. Отечественными исследователями доказано, при долгосрочном пребывании пациента в хирургическом стационаре, в частности ОРИТ, увеличивается долю экзогенного инфицирования *P. aeruginosa* достигает 50% (Сиянова и др., 2018).

В связи с этим увеличивается число регистрируемых случаев передачи неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов через медицинское оборудование (аппараты ИВЛ) и предметы специального ухода за пациентами (Donlan, 2001). По результатам исследований катетер-ассоциированных инфекций кровотока, возбудителем которых в 4,9-6% случаев была определена *Pseudomonas aeruginosa*, было отмечено, что контаминация медицинских инструментов и распространение возбудителя производились через кожу рук медицинского персонала (Бережанский,

Жевнерев, 2006). При несоблюдении правил асептики и антисептики, во внутрибольничной среде условно-патогенную неферментирующую палочку выделяют с поверхности столов, раковин, систем кондиционирования воздуха, посуды и остатков пищи. Широкое распространение *Pseudomonas aeruginosa* обусловлено способностью бактерии активно размножаться в условиях достаточной влажности и в широком диапазоне температур, что, в свою очередь, создает опасность контаминации препаратов, которые хранят в холодильниках при 4°C (Козлов, 2000).

В детских клиниках неферментирующие бактерии зачастую становятся причиной различных патологических заболеваний у новорожденных, к числу которых относят конъюнктивит, инфекции кожи, диарея, пневмония, сепсис (Телятицкий, Абаев, 2010), (Кузнецова и др., 2011). Результаты мониторинга возбудителей инфекционных заболеваний среди новорожденных свидетельствуют о выделении *P. aeruginosa* в спектре микробных культур выделяют в 25,5% случаев. Также отмечено, что чаще страдают дети в отделениях ОРИТ, находящихся на парентеральном питании (Самсыгина, 2003).

По некоторым данным, касающихся этиологии вентилятор-ассоциированной пневмонии, у новорожденных в ОРИТ часто встречались такие микроорганизмы, как *K. Pneumoniae* и *P. aeruginosa* (Фадеева и др., 2001). Микроорганизмы группы НФГОб обладают не меньшей этиологической значимостью, по сравнению с грамположительными бактериями (представители родов *Staphylococcus* и *Streptococcus*) при инфицировании детей возрастает в более старшем возрасте (Кузнецова, 2011). Распространение *P. aeruginosa* в ОРИТ в педиатрической сети достигает 33,2% среди бактерий условно-патогенной группы, а в неонатальных отделениях – 17% (Foglia, et al, 2007). Некоторые факторы риска инфицирования новорожденных *Pseudomonas aeruginosa* могут стать причиной младенческой смертности. К числу таких факторов относят

наличие венозного катетера, длительное использование наличие венозного катетера антибактериальных препаратов, общую иммунную недостаточность, низкий вес при рождении (Gras-Le Guen, et al, 2003).

### 1.2.2. Этиологическое значение *Pseudomonas mendocina*

*Pseudomonas mendocina* была выделена N. Palleroni в 1970 году из почвы и водных образцов в Мендосе, Аргентина (Palleroni, et al, 1970). Изначально считалось, что неферментирующая грамотрицательная бактерия обладает невыраженными вирулентными свойствами и не способна самостоятельно, без сопутствующей микрофлоры, являться причиной инфицирования. Бактерия обладает низкой патогенностью, по сравнению с *P. aeruginosa*, и крайне редко встречается в клинических образцах как болезнетворный микроорганизм (Palleroni, et al, 1970), (Aragone, et al, 1992).

В 1992 году в клинической практике был зафиксирован первый случай инфицирования эндокардита *Pseudomonas mendocina* (Aragone, et al, 1992). В литературе описаны 8 случаев инфицирования *P. mendocina*, пять из которых сопровождались бактериемией (Aragone, et al, 1992), (Johansen, et al, 2001), (Mert, et al, 2007), (Nseir, et al, 2011), (Suel, et al, 2011) в оставшихся трёх - инфекционный агент был напрямую связан с костями и мягкими тканями пациентов (Chi, et al, 2005), (Chiu, et al, 2013), (Howe, et al, 2013). По литературным данным, среди пяти пациентов с бактериемией, в 80% (в четырех случаях) был зафиксирован инфекционный эндокардит с врожденным клапанным пороком сердца. Несмотря на серьезные инфекционные осложнения, в которых в качестве этиологического агента выступает *P. mendocina*, зарубежные исследователи отмечают низкую смертность пациентов (Nseir, et al, 2011).

Источник заражения и пути передачи условно-патогенной неферментирующей бактерии достоверно не известны, но предполагается, что заражение могло произойти при контактном взаимодействии

инфицированной воды или почвы с открытым повреждением кожных покровов (Johansen, et al, 2001). *P. mendocina*, наряду с другими микроорганизмами группы НФГОБ, способна циркулировать во внутрибольничной среде, распространяясь через руки медицинского персонала. Учитывая тот факт, что некоторые представители рода *Pseudomonas* способны формировать биопленку на различных поверхностях, был проведен анализ катетеров пациентов на заселенность микроорганизмами, в ходе которого *Pseudomonas mendocina* не была выявлена (Warady, et al, 2012).

### 1.3. Морфологические свойства

*Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas mendocina* представляют собой свободноживущие прямые или искривленные с закруглёнными концами грамотрицательные палочки, размером 1,0-5,0×0,5-1,0 мкм (Смирнов, 1990). Спор не образуют, образуют пили IV типа (фимбрии), гидрофобные концы которых закручиваются. В мазках чистых культур палочки расположены одиночно, попарно или в виде коротких цепочек. В мазках из патологического материала, как правило, обнаруживаются в цитоплазме фагоцитов, при этом палочки могут быть деформированы, в клиническом материале полиморфизм отсутствует, внутриклеточные включения не наблюдаются.

В нативных препаратах бактерии подвижны за счет наличия одного, редко двух полярно расположенных жгутиков. Поверхность бактерий покрыта микроворсинками. При определенных условиях могут продуцировать капсулоподобную внеклеточную слизь полисахаридной природы, покрывающую тонким слоем микробную клетку, вирулентные (мукоидные) штаммы секретируют гликопротеидную оболочку более интенсивно, что дает основание рассматривать слизь как фактор патогенности (Смирнов, 1990).



#### 1.4. Культуральные свойства

Большинство представителей рода *Pseudomonas* по типу дыхания относят к облигатным аэробам (Смирнов, 1990). *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas mendocina* не требуют специальных условий для культивирования, отличаются ограниченной потребностью в питательных веществах, что обеспечивает жизнеспособность в экстремальных условиях при недостатке источников питания (Зубков, 2003). Микроорганизмы являются хемоорганогетеротрофами, способны использовать в качестве источника энергии и углеродов различные органические соединения. *P. aeruginosa* способна усваивать 54-73 различных субстратов, *P. mendocina* 22-36 (Смирнов, 1990). Исследователями отмечается, что штаммы двух видов одинаково хорошо растут на синтетических средах с 1-1,5% содержанием этанола и на средах с грозненским парафином (Смирнов, 1990).

В качестве диагностического признака используют способность *Pseudomonas aeruginosa* расти при 42°C (оптимальная температура – 37°C) на простых питательных средах, таких как мясо-пептонный агар (среда окрашивается пигментом в сине-зелёный цвет) и бульон (в среде помутнение и плёнка сине-зеленого цвета). Селективными средами являются цитримидный (предложен E.J.L. Lowbury в 1951 г.) и ацетамидный (предложен G.L. Gilardi в 1974 г.) агары. На твердых питательных средах *P. aeruginosa* диссоциирует на R-, S-, M-формы (Милько, Мартынкина, 1996). Запах жасмина культуре микроорганизмов придают синтезируемый ими триметиламин. Протеолитическая активность бактерии высокая, выражается в способности свертывать сыворотку крови, разжижать желатин, гидролизировать казеин. Сахаролитическая активность низкая, так как синегнойная палочка расщепляет глюкозу, но не способна к ферментативному окислению других углеводов. *P. aeruginosa* относится к группе флюоресцирующих бактерий (Смирнов,

1990), продуцирует такие пигменты как пиоцианин (придает питательной среде сине-зеленый цвет), пиовердин (желто-зелёное окрашивание среды) и пиорубин (бурое окрашивание).

*P. mendocina* относится к группе нефлюоресцирующих видов рода *Pseudomonas*. На твердых питательных средах при температуре 20-30°C (при денитрификации - 42°C) свежевыделенные штаммы формируют характерные сухие, морщинистые колонии, которые через несколько дней снимаются с агара целиком. На плотной среде образуют углубление, на кровяном агаре через 48 часов наблюдается диффузный лизис эритроцитов. Бактерии способны гидролизировать крахмал в качестве единственного источника углерода, но слабо усваивают полиспирты и некоторые углеродные соединения к числу которых относят маннит, мальтозу и гликолат (Смирнов, 1990). *P. mendocina* синтезируют желтый внутриклеточный пигмент каротиноидной природы.

В литературе описан экспериментальный опыт, в ходе которого для культивирования *P. mendocina* использовали субстрат пентахлорфенол (ПХФ) в качестве единственного источника энергии. Было установлено, что штаммы микроорганизма способны минерализовать высокую концентрацию ПХФ (до 150 мг/л) и разрушать ингибирующие побочные продукты биodeградации субстрата, избегая тем самым накопление токсичных соединений. Измерив концентрацию высвободившегося кислорода, исследователи определили оптимальные параметры среды для роста *P. mendocina* такие как: подкисленная среда ( $6 < \text{pH} < 7$ ), аэробная и относительно умеренная температура. (20-30°C) (Смирнов, 1990).

## **1.5. Продукция факторов патогенности**

### *1.5.1. Продукция факторов патогенности Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* является типичным представителем рода *Pseudomonas*, обладает широким спектром факторов вирулентности, что

обуславливает способность бактерии вызывать различные инфекционные процессы в органах или тканях организма. Некоторые факторы патогенности ассоциированы с клеточной стенкой, к ним относятся находящиеся на поверхности жгутики и пили, «неплевые» адгезины, липополисахарид. К группе экстрацеллюлярных факторов относят экзотоксин А, гемолизины, продуцируемые бактериальной клеткой ферменты и пигменты. Под контролем регуляторного комплекса QS происходит скоординированный синтез внеклеточных ферментов и образование биопленок (Delden, Iglewski, 1998). Помимо вышеперечисленных агентов, к факторам вирулентности относят белки системы транспорта железа и реутилизации пуринов, позволяющие микроорганизму переносить дефицит необходимых для жизнедеятельности веществ.

**Экзотоксин А.** Экзотоксин А представляет собой экстрацеллюлярный белковый продукт с молекулярной массой 66кДа, который бактериальная клетка продуцирует в ферментативно неактивной форме (Lerpla, et al, 1978). Молекула энзима состоит из одной полипептидной цепи длиной 613 аминокислот (GenBank AAB59097). По результатам анализа трехмерной структуры экзотоксина А установлено, что белок состоит из трех функциональных областей: рецептор-связывающей (домен 1, аминокислотные остатки 1-252), транслокационной (домен 2, аминокислотные остатки 253-364) и каталитической (домен 3, аминокислотные остатки 405-613). Для реализации каталитической активности, которая заключается в инактивации фактора элонгации – 2 (ФЭ-2), требуется участие домена 3 и часть домена Ib (аминокислотные остатки 365-404) (Siegall, et al, 1989). Установлено, в каталитическом центре значимыми аминокислотами являются His-440, Tyr-470, Glu-553 (Armstrong, et al, 2002).

Цитотоксическое действие экзотоксина А заключается в подавлении синтеза белка в чувствительных клетках. Блокирование белкового синтеза

осуществляется на рибосомах в присутствии никотинамид-аденин-динуклеотида (НАД) на этапе элонгации полипептидной цепи. По некоторым данным, НАД является субстратом внутриклеточных физиологических реакций и кофактором в биологических окислительно-восстановительных реакциях. Под действием токсичного фермента происходит ферментативный гидролиз НАД с образованием аденозин-5'-дифосфатрибозильного остатка (АДФ-рибоза) и никотинамида. АДФ-рибоза, в свою очередь, связывается с фактора элонгации - 2 в прочный комплекс, который будет не способен участвовать в удлинении полипептидной цепи при синтезе белка, что приведет к гибели клеток (Armstrong, et al, 2002). Молекулярный механизм действия экзотоксина А на этапе специфического связывания с чувствительными клетками осуществляется посредством связывания N-концевого домена 1 фермента с поверхностью клеток-мишеней через рецепторы липопротеинов низкой плотности (LRP1), который затем проникает в клетку путем эндоцитоза (Као, et al, 2010). Далее молекула токсина подвергается протеолитической обработке сериновой протеазой, которая разрывает связи в домене 2 между аминокислотными остатками Arg279 и Gly280, и в результате изменения конформации фермента происходит высвобождение ферментативно активного центра (Yang, et al, 2012). Через внутреннюю мембрану домен 2 осуществляет перенос токсина в цитозоль клетки, где происходит столкновение экзотоксина А с фактором элонгации - 2 и передача АДФ-рибозильной группы остатку дифтамида, что необратимо инактивирует ФЭ-2 (Sanyal, et al, 1993).

Установлено, что в общем токсическом эффекте *in vitro* действие экзотоксина проявляется в отёках, метаболическом ацидозе, некрозах, дыхательной недостаточности и т.д. У пациентов, которые были инфицированы *Pseudomonas aeruginosa*, выявляют в сыворотке крови высокие титры антител против экзотоксина А (Sato, Frank, 2011).

Считалось, что 80% клинических изолятов *P. aeruginosa* продуцируют экзотоксин А и 27% штаммов, которые были выделены из окружающей среды (Diaz, et al, 2011). Был проведен ряд исследований, в результате которых было засвидетельствовано, что количество токсигенных культур возросло до 90,7-96% (Nikbin, et al, 2012). Изучение генетических особенностей штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из различных клинических материалов, показало, что у 98% раневых и «бронхиальных» культур и у 81,8% штаммов, выделенных из мочи, главным фактором патогенности является экзотоксин А (Wolska, et al, 2011). На основе этих фактов, ген *toxA* был предложен в качестве мишени для детекции и типирования клинических изолятов *P. aeruginosa* (Khan, Cerniglia, 1994).

**Белки III типа секреции.** Белки III типа системы секреции (TTSS) являются контакт-зависимой системой у представителей рода *Pseudomonas* (Yahr, et al, 1995), которая осуществляет прямое перемещение бактериальных белков в цитоплазму эукариотических клеток-мишеней (Vallis, et al, 1999). Установлено, что TTSS *P. aeruginosa* включает в себя 36 генов, которые, помимо эффекторов, кодируют также регулирующие и координирующие белки, молекулярное взаимодействие которых происходит непосредственно во время экспрессии *tox*-генов (Frank, 1997). При изучении особенностей регуляции белков TTSS-системы показано, что большая часть компонентов системы контролируется транскрипционным активатором ExsA (Hovey, et al, 1995), действие которого усиливается в условиях дефицита ионов кальция (Cornelis, 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* производит четыре токсина типа III, каждый из которых способен функционировать в качестве фактора вирулентности (Lee, et al, 2005). *P. aeruginosa* использует TTSS-систему для транслокации эффекторных белков таких как ExoT, ExoS, ExoU, ExoY (Filloux, 2011). Эти токсины напрямую связаны с инвазивными клиническими изолятами, по тому как способны изменяться различных в клинических условиях

(Vance, et al, 2005). Более 80% штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из острых инфекций, включая связанную с вентиляцией пневмонию и сепсис, экспрессируют эти токсины (Hauser, et al, 2002). В условиях хронической инфекции, как и при кистозном фиброзе, экспрессия токсина значительно снижается (Goodman, et al, 2004). Активность каждого из токсинов зависит от типа клетки-хозяина. Так, эпителиальные клетки более чувствительны к ExoS-интоксикации, чем фибробласты или макрофаги (Rucks, et al, 2003). ExoU по своей природе является фосфолипазой, характеризуется наиболее разрушительным воздействием на макроорганизм, обнаруживается у небольшого числа клинических изолятов (Ciara, et al, 2004). Также известно, что токсин ExoU проявляет клеточно-опосредованную гемолитическую активность, которая способна влиять на процесс некроза в эпителиальных клетках и макрофагах (Rholl, et al, 2008). ExoY представляет собой аденилатциклазу, которая имеет небольшое этиологическое значение при пневмонии лабораторных мышей (Vance, et al, 2005), но может инициировать активность других токсинов. ExoS и ExoT связаны с бифункциональными ферментами, характерными для большинства вирулентных штаммов (Sun, et al, 2004). ExoT и ExoS ферменты содержат две функциональные области (домены): карбокситерминальный фрагмент обладает АДФ-рибозилтрансферазной активностью, аминотерминальный фрагмент отвечает за активацию GTP-азу (малые G-белки связывают и гидролизуют гуанозинтрифосфат) (Frank, 1997). В эукариотических клетках через Ras-зависимый путь передачи сигнала токсины (ExoT и ExoS) участвуют в деформации актиновых филаментов цитоскелета [50]. В частности, именно N-концевой домен ExoS обладает свойствами GTPase-активирующего белка (GAP), патогенное действие которого нацелено на Rho GTPases (клеточные сигнальные белки суперсемейства Ras), участвующих в регуляции многих аспектов внутриклеточной динамики актина (Sun, et al, 2004). АДФ-рибозилтрансферазная активность ExoS стимулирует апоптоз в клетках

HeLa, линиях фибробластов и эпителиальных клетках, что в свою очередь определяет способность *Pseudomonas aeruginosa* колонизировать эпителиальные клетки и кровоток организма (Balachandran, et al, 2007). ExoT способен взаимодействовать с лигазой убиквитина лития Cb-b-хозяина и ингибировать интернализацию поверхностных рецепторов бактерий в эукариотических клетках посредством активации N-концевой Rho-GTPase и ADP-рибозилирования (ADPR) (Lanotte, et al, 2013).

Комбинации экзоэнзимов (ExoT, ExoS, ExoU, ExoY) определяют характер взаимодействия *P. aeruginosa* с клетками-мишенями. К примеру, «инвазивные» изоляты, которые продуцируют ExoT, ExoS и ExoY, способны колонизировать эпителиальные клетки и реплицироваться в тканях, а цитотоксические штаммы (ExoT, ExoU и ExoY) лизируют клетки хозяев (Lin, et al, 2006).

На основе цитотоксичности эффекторных белков, действие которых направлено на макрофаги, выделили четыре группы фенотипов, среди которых наиболее вирулентные ExoU-продуценты (1 тип – обладают высокой цитотоксичностью) и штаммы, содержащие токсин ExoS (2 тип – диссеминируют в ткани и органы) (Michel-Briand, Baysee, 2002).

Клинические исследования 1 и 2 фенотипов *P. aeruginosa* отмечаются неудовлетворительным исходом болезни среди пациентов, инфицированных неферментирующей грамотрицательной палочкой (Кузнецова и др., 2011).

Исследование группы из 100 клинических и природных изолятов на наличие в штаммах тех или иных эффекторных белков показало, что гены, кодирующие токсины ExoS и ExoU, присутствовали в 72% и 28% случаях соответственно, а ген exoY – 89% (Deprele, et al, 2004). Используя метод ПЦР было проведено исследование, результаты которого показали, что наличие в геноме бактерии гена exoU связано с феноменом биопленкообразования (Lin, et al, 2006).

**Фосфолипазы.** Штаммы *P. aeruginosa* продуцируют гемолитические (PlcHR (2)) и негемолитические (PlcN) фосфолипазы С (ЕС 3.1.4.3), которые транслоцируются посредством ТАТ-системы (Twin-arginine translocation) через внутреннюю мембрану клетки-мишени (Klaenhammer, 1993.). По некоторым данным, Sec-система патогенной палочки способна также секретировать фосфолипазу PlcB, работу которой регулирует QS-система (Benjamin, et al, 1991).

Секвенирование генома *P. aeruginosa* показало, что продукцию PlcHR (2) контролирует оперон PlcHR, состоящий из структурного гена plcH, кодирующего гемолизин (380-аминокислотный пептид), гена plcR1 и plcR2, продукты которых участвуют в регуляции синтеза на уровне транскрипции (Michel-Briand, Baysee, 2002).

Исследование ферментативной активности более 100 клинических изолятов *P. aeruginosa* показало, что фосфолипазы С PlcHR (2) и PlcN широко распространены среди продукции штаммов микроорганизмов: в 100% и 91,8% соответственно (Wolska, Szweda, 2009).

**Рамнолипиды.** Рамнолипиды *Pseudomonas aeruginosa* обуславливают поверхностное натяжение и гидрофобность клеточной стенки бактерии, способны облегчать жгутиковую подвижность относительно полутвердых поверхностей (Caiazza, et al, 2007). *P. aeruginosa* продуцирует монорамнолипид и дирамнолипид, которые относятся к классу растворимых термостабильных гликолипидов. Являясь архитектурным компонентом «fluid-filled» каналов в биопленке, рамнолипиды осуществляют обмен питательными веществами между клетками бактерий (Davey, et al, 2003). Дирамнолипиды используются также в качестве субстрата для фосфолипазы С, иницируя ферментативную активность энзима (Abdel-Mawgoud, et al, 2010).

При изучении генома *P. aeruginosa* было установлено, что гены rhlA и rhlB кодируют полипептиды рамнозилтрансферазы RhlA и RhlB, которые принимают участие в синтезе рамнолипидов, а ген rhlC кодирует белок



RhlC, который катализирует образование дирамнолипида (Maier, Soberon-Chavez, 2000). Располагаясь в одном опероне, гены *rhlA* и *rhlB* регулирует вторая межклеточная сигнальная *rhl*-система (Lequette, Greenberg, 2005).

Помимо факторов патогенности, *Pseudomonas aeruginosa* продуцирует антимикробные соединения, к которым относятся феназиновые пигменты (пиоцианины), феназины, хинолины и фенилпирролы. Антимикробные агенты вызывают деполяризацию внутренней цитоплазматической мембраны микроорганизмов и тем самым подавляют рост сопутствующей микрофлоры (Michel-Briand, Baysee, 2002). Отмечается, что пиоцианины обладают антимикробной активностью по отношению ко многим видам бактерий, пиоцины действуют на близкородственные виды, в то время как хинолиновые производные (псевданы) негативно воздействуют только на грамположительные микроорганизмы (Williams, 2003).

**Пиоцианин.** Антимикробная активность *Pseudomonas aeruginosa* обусловлена продукцией пигментов, производных феназина, таких как пиоцианин, гемипиоцианин, тубермицин В и оксихлорографин (Gibson, et al, 2009). Известно, что 90-95% высоковирулентных штаммов *P. aeruginosa* синтезируют пиоцианин в больших количествах (Dara, et al, 2012). Пиоцианин представляет собой голубовато-зелёный водорастворимый пигмент, придающий характерный цвет инфицированного гноя и мокроты. Предполагается, что именно продукция этого пигмента, обладая окислительно-восстановительной активностью, способствует закреплению бактерии в органах дыхания при лёгочных пневмониях и влияет на степень тяжести сепсиса в организме (Hovey, et al, 2002). Синтез пиоцианина осуществляется при участии ферментов PhzS и PhzM, кодирующие гены которых взаимосвязанных с *hxA1-phzG* опероном, регулирующим экспрессию синтеза феназинов (Фадеева и др., 2001).

**Пиоцин.** Пиоцины обладают избирательной антимикробной активностью, то есть способны подавлять рост близкородственных видов

(Klaenhammer, 1993). Более 90% всех клинических и природных изолятов *P. aeruginosa* вырабатывают бактериоцины R, F и S типов, представляющие собой парные полипептидные комплексы. Пиоцины обладают пороформирующим механизмом повреждения (Michel-Briand, Baysee, 2002). Различные модификации S-пиоцина, проникнув в ядро клетки-мишени, могут стимулировать деструкцию хромосомной ДНК (Williams, 2003) и тормозить функцию транспортной РНК (Michel-Briand, Baysee, 2002).

**Сидерофоры.** *Pseudomonas aeruginosa* производит внеклеточное соединение с желтовато-зеленой флуоресценцией, называемое пиовердином, которое функционирует как сидерофор. Сидерофоры представляют собой железо-хелатирующие молекулы, которые синтезируются в бактерии при недостатке свободного железа. Сидерофоровая функция пиовердина может быть связана с патогенностью этой бактерии, потому что пиовердин стимулировал рост не только в среде с дефицитом железа, но также в определенной среде, содержащей трансферрин и в сыворотке или плазме человека (Adams, 1985).

Экспериментальные данные исследователей указывают, что сидерофоры не только являются сигнальными молекулами для активации экзотоксина А и пиовердина (Beare, et al, 2003), но и участвуют в процессе формирования биопленок при хронической инфекции в легких (Peek, et al, 2012).

**Протеазы.** До 90% клинических изолятов *P. aeruginosa* продуцируют ферменты, обладающие высокой протеолитической активностью, к числу которых относятся: щелочные протеазы, эластазы LasA и LasB (Adams, 1985). Эластин в составе легочной ткани выполняет функцию сокращения и расширения органа дыхания, а также определяет упругость стенок кровеносных сосудов. LasA-эластаза обладает способностью повреждать эластин, что делает его более чувствительным к негативному воздействию LasB-эластазы и щелочной протеазы (Delden,

Iglewski, 1998). LasB-эластаза способна не только разрушать тканевые компоненты, но и вмешивается в механизм защиты хозяина, так как может инактивировать человеческие иммуноглобулины класса G, ингибитор  $\alpha 1$ -протеинкиназы, компоненты комплимента и лизоцим (Као, et al, 2005).

Ген *lasR Pseudomonas aeruginosa* необходим для транскрипции генов для эластазной (*lasB*) и LasA-протеазы (*lasA*), двух протеаз, связанных с вирулентностью. Ген *lasR* также усиливает продукцию экзотоксина А. Анализ PAO-R1, содержащего промотор *toxA*, слитый с бета-галактозидазой, указывает на то, что LasR действует на промотор *toxA* или в прототипах *currentA mRNA*. Активность бета-галактозидазы была примерно на 40% ниже в PAO-R1, чем в родительском штамме, PAO-SR. Кроме того, эффект LasR на промотор *toxA* обусловлен не стимуляцией транскрипции *regA*, транскрипционного активатора *toxA* (Gambello, et al, 1993).

**Способность к биопленкообразованию.** Эпидемические штаммы возбудителей обладают такими физиологическими свойствами, метаболическим потенциалом и факторами вирулентности, которые обеспечивают им существование в двух формах: в виде подвижной формы и фиксированной биопленки. Подвижная форма обеспечивает движение, позволяющее колонизировать различные среды обитания, а биопленка осуществляет защищает колонии от неблагоприятных факторов внешней среды.

*Pseudomonas aeruginosa* относится к числу бактерий, образующих микробные сообщества, отдельные микроорганизмы которых способны скоординировано регулировать поведенческие реакции в зависимости от изменяющихся условий окружающей среды (Николаев, Плакунов, 2007). Способность неферментирующей палочки к биопленкообразованию значительно повышает её эпидемический потенциал и позволяет бактерии в короткие сроки (7 суток) формировать госпитальные штаммы, вызывать вспышки инфекционных заболеваний (Lee, et al, 2006).

Для запуска процесса формирования биопленки необходимо сближение «поверхностей» микроорганизмов, что достигается или ненамеренно, с током жидкости по поверхности, или направленно, посредством хемотаксиса. Синегнойная палочка способна двигаться вдоль поверхности несколькими способами, такими как скольжение, дергание и роение (Murray, Kazmierczak, 2008). Отмечается, что роение и дергание бактерии, осуществляемые адгезией к поверхности и пиями IV типа и толчками полярного жгутика, ассоциированы с формированием биопленки (Drusano, 2003.).

Образование микробной биопленки невозможно без осуществления процесса адгезии сблизившихся бактерий к доступной для колонизации поверхности. Посредством работы пилей IV типа, взаимодействующих с муцином слизистых оболочек, пилеподобных структур, известными как Сур-фимбрии, и жгутиков, поверхность которых содержит рецепторные лиганды, происходит специфическая адгезия *Pseudomonas aeruginosa* к эукариотическим клеткам (Murray, Kazmierczak, 2008). Микроорганизмы группы НФГОб неспецифически адгезируется также на полиэтиленовых поверхностях имплантируемых медицинских устройствах, что возможно благодаря гидрофильности клеточной стенки бактерии и продукция биосуффрактантов (Roosjen, et al, 2006).

Основным компонентом зрелой биопленки *Pseudomonas aeruginosa* является экзополисахаридный матрикс, который формируют экзополисахариды Psl, Pel и альгинат (Ghafoor, et al, 2011). Слипание клеток через экзополисахаридные компоненты, в частности альгинат, формируют коагрегаты, защищающие биопленочные бактерии от эффекторов иммунитета макроорганизма, антибактериальных агентов (Маянский, 2012) и некоторых антибиотиков (Цветкова и др., 2013). В биопленке некоторых штаммов *P. aeruginosa* обнаружены мембранные пузырьки, содержащие ферменты для лизиса части клеток, которые будут

использоваться в качестве факторов роста для микробного сообщества (Schooling, Beveridge, 2006).

Если источники питания микроколонии бактерий истощаются, синегнойная палочка синтезирует суффрактанты, которые способны разъединить плотные контакты между клетками в биопленке, в результате микроорганизмы высвобождаются в виде свободных одиночных форм (Smith, Iglewski, 2003). Деструкция биопленки возможна при инфицировании биопленочной колонии бактериофагом, вносящим радикальные изменения в процесс экспрессии генов бактерий (Руднов, Зубарев, 2008).

#### 1.5.2. Продукция факторов патогенности *P. mendocina*

Наличие одного полярного жгутика и несколько более коротких латеральных жгутиков, при выращивании бактерий на агаризованной среде – является отличительной особенностью *Pseudomonas mendocina*.

**Белки семейства MviN.** Ген Pmen\_4277, находящийся в локусе хромосомы MDS\_1039, способен продуцировать протеины, которые определяют один из факторов патогенности *P. mendocina*. Молекулярная масса белка составляет 55879,5 кДа. Анализ аминокислотной последовательности MviN показал, что протеин имеет в своем составе 14 трансмембранных доменов, указывающих на принадлежность MviN к интегральным мембранным белкам. Исследователи отнесли белок к семейству «MviN МАТЕ» (мульти-антимикробная экструзия) (Azusa, et al, 2008). Интегральные белки MviN были выявлены не только у представителя рода *Pseudomonas*, но и у некоторых других патогенных микроорганизмов - *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* (Benjamin, et al, 2008). Мембранные белки определяют устойчивость микроорганизма к широкому спектру катионных красителей, фторхинолонов, аминогликозидов, различных структурных антител и лекарств (Omote, et al, 2006).

При экспериментальном наблюдении регуляции мембранных протеинов MviN *in vitro* (Van Dam, et al, 1998), исследователями было доказано причастие этих белков к производству полисахаридов, таких как RfbX (Wzx) (Зубков, 2008) и WzxE (Rick, et al, 2003), которые были вовлечены в биосинтез O-антигена *E. coli*, и эукариот RFT1, необходимые для транслокации промежуточного соединения долихлдифосфат - GlcNAc, олигосахаридного комплекса, используемого в протеиновом гликозилировании на цитозольной стороне эндоплазматической ретикулярной мембраны (Helenius, et al, 2002). Эти результаты показывают, что интегральные мембранные белки принимают участие в трансмембранном транспорте предшественников пептидогликана через внутреннюю мембрану.

Группа белков MviN способна не только транспортировать липидсвязанные пептидогликановые предшественники от внутреннего к внешнему лифту цитоплазматической мембраны, а также непосредственно участвовать в синтезе пептидогликана (Kato, et al, 2010). Эту версию подтверждают результаты экспериментально опыта, результаты которого доказали потерю упругости и жесткости клеточной стенки микроорганизмов вследствие нарушения синтеза пептидогликана при воздействии на клетки непермиссивной температуры (Guan, et al, 2016). Исследование уровней промежуточных продуктов биосинтеза клеточной стенки в мутантах *mviN* подтвердило участие гена *mviN* (*pten\_4277*) в регуляции метаболизма промежуточных продуктов липидов синтеза пептидогликана (Azusa, et al, 2008).

Пептидогликан, основной компонент стенок бактериальных клеток, состоит из гликановых цепей, сшитых между собой пептидными мостиками. Липид-связанный пептидогликановый предшественник (липид II) образуется в цитоплазме с помощью серии высококонсервативных ферментативных стадий. Белки семейства MviN были идентифицированы у *Francisella tularensis* в качестве фактора, ответственного за переход

липида II через цитоплазматическую мембрану (Tyler, et al, 2010). Пенициллинсвязывающие белки, находящиеся на периплазматической стороне мембраны, используют липид II для генерации зрелого пептидогликана.

Продукты синтеза гена *mviN* необходимы для поддержания активной жизнедеятельности некоторых микроорганизмов, к числу которых относят *Sinorhizobium meliloti*, *Burkholderia pseudomallei*, *Escherichia coli*. Так мутантные штаммы *E. coli*, лишённые функционального *mviN*, не могут расти и подвергаться лизису.

### 1.6. MALDI-TOF масс-спектрометрия

Методы масс-спектрометрии, в частности времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI TOF MS), являются мощным инструментом в руках сотрудников лабораторий, и используется для решения стратегических вопросов современной микробиологии.

Ключевые термины MALDI-TOF масс-спектрометрии: **Масс-спектрометрия** – метод идентификации молекул путем измерения отношения их массы к заряду в ионизированном состоянии. **MALDI** (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) – ионизация вещества с добавлением матрикса под действием лазерного излучения. **TOF MS** (Time of Flight Mass-Spectrometry) – время пролетная масс-спектрометрия, в результате которой масса молекулы оценивается по времени пролета от источника ионизации до детектора.

Методика идентификации на Vitek MS (MALDI-TOF):

#### 1 ЭТАП: Подготовка образца

Технически процедура пробоподготовки проста: небольшое количество образца бактериальной культуры с чашки Петри (одна колония) бактериальной петлей наносится в лунку на одноразовый слайд. Далее наносится матрица VITEK MS-CHCA (органическая 2',5' дигидроксибензойная кислота), образующая при высыхании на воздухе

кристаллы: происходит сокристаллизация - молекулы бактериальных белков оказываются включенными в толщу кристаллов матрицы, что обеспечивает их дальнейшую ионизацию и масс-спектрометрический анализ.

Одноразовые слайды с уникальным штрих-кодом не требуют обработки и позволяют избежать внесения данных вручную, что позволяет исключить риск контаминации. Одновременно могут быть параллельно анализированы системой до 4 слайдов с 48 позициями на каждом (192 образца), что позволяет гибко тестировать как малые, так и крупные партии образцов.

## 2 ЭТАП: Идентификация

Образец помещают в прибор и подвергают воздействию наносекундных лазерных импульсов, при этом матрикс испаряется, а образец под действием электрического поля приобретает положительный заряд. Программное обеспечение прибора (Advanced Reporting Tool - bioART™) оценивает время пролета частиц с ускорением от источника ионизации к детектору и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Масс-спектр сравнивается со спектрами из базы данных и на основании сведений о массах происходит идентификация микроорганизмов. База данных состоит из более 950 клинически значимых видов (бактерий, дрожжей, плесневых грибов/дерматофитов, микобактерий) и более 25 000 спектров. Для каждого вида микроорганизмов в базе данных присутствуют спектры большого количества штаммов.

Использование метода масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов имеет ряд преимуществ, главными из которых являются:

- Непревзойденная скорость исследования: менее 2 минут для получения достоверного результата



- Простота использования: материалом может служить первичная колония, не требуется окрашивания по Граму и микроскопического исследования
- Высокая производительность: одновременное получение достоверных результатов 192 образцов
- Информативность и простота интерпретации результатов
- Прослеживаемость: слайды со штрих-кодами и удобное программное обеспечение.

Определение антибиотикочувствительности идентифицируемых культур проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе Vitek 2 Compact («BioMerieux», Франция). Оборудование было синхронизировано с помощью пакета прикладного программного обеспечения MYLA.

Использование MALDI-TOF масс-спектрометрии в сочетании с автоматизацией исследования чувствительности к антибиотикам позволяет не только точно и быстро определить виды микроорганизмов, но и чувствительность их к конкретным антибиотикам в минимальных ингибирующих концентрациях.

### **1.7. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**

К числу наиболее часто используемых методов молекулярной биологии относится полимеразная цепная реакция (ПЦР). Метод ПЦР изобрел в 1983 г. американский ученый Кэри Мюллис, получивший впоследствии за это изобретение Нобелевскую премию. Сущность метода заключается в том, что он имитирует естественную репликацию нуклеиновых кислот и позволяет получать фрагменты последовательности ДНК, характерные для того или иного микроорганизма, в количествах, достаточных для их распознавания. В соответствии с этим принципом проведение ПЦР-анализа включает в себя три основных этапа: пробоподготовка (выделение нуклеиновых кислот ДНК/РНК из

клинического материала), амплификация (экспоненциальное увеличение количества целевых участков ДНК), регистрация и интерпретация полученных результатов. Детекция продуктов амплификации осуществляется путем проведения электрофореза в агарозном геле, гибридизации со специфическим олигонуклеотидным зондом, с использованием метода масс-спектрометрии (Wolska, et al, 2009).

Проведение анализа методом ПЦР позволяет напрямую определять возбудителей в биологическом материале, высокая чувствительность улавливает минимальное количество ДНК патогена, а специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что минимизирует возможность ложноположительного результата.

На сегодняшний день метод ПЦР и его модификации очень широко используются в клинической практике, в том числе и для диагностики нозокомиальных инфекций. Метод позволяет определять экспрессию генов, регулирующих образование рецепторов или секреторных продуктов в клетке (Rick, et al, 2003), проводить качественный и количественный анализ различных биологических материалов (Socransky, et al, 2000).

## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Общая характеристика материала и методов исследования

Сбор коллекции проводился на базе микробиологической лаборатории отделения клинической лабораторной диагностики Клиники БГМУ. Отбор клинического материала от больных проводили в период с сентября 2016 по сентябрь 2017 года.

Отбирались культуры неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФГОб), выделенных при микробиологическом исследовании биоматериала (мокроты, мочи, раневого отделяемого). НФГОб представляют собой мелкие грамотрицательные палочки, расположенные чаще разрозненно, реже попарно или в виде коротких цепочек. Представители НФГОб не образуют спор, многие имеют капсулу, могут быть подвижны.

Взятие биоматериала осуществлялось до начала приема химиопрепаратов и местных манипуляций с соблюдением правил асептики и антисептики в профильных отделениях стационара у пациентов.

Материал для исследования:

Утренняя мокрота, выделяющаяся у больных во время приступа кашля, собиралась в стерильную емкость с завинчивающейся крышкой. Перед откашливанием больной чистил зубы и полоскал рот кипяченой водой с целью механического удаления остатков пищи, слущенного эпителия и микрофлоры ротовой полости;

Содержимое гнойных ран – забор проводился медицинской сестрой у больных хирургического профиля.

Моча – собиралась средняя порция утренней мочи в количестве 5-10 мл в стерильную емкость с завинчивающейся крышкой, с предварительным тщательным туалетом наружных половых органов.

Материал доставляли в лабораторию в течение 0,5-1 часа со времени его получения.

Хранение культур осуществлялось при температуре 4-8 °С в пробирках с полужидким питательным агаром, залитые стерильным вазелиновым маслом.

Образцы биологического материала исследовали с помощью бактериологического посева, методом масс-спектрометрии, классической постановки ПЦР с последующей детекцией ПЦР-продуктов методом агарозного гель-электрофореза.

## 2.2. Бактериологическое исследование

### 2.2.1. Подготовка лабораторной посуды к стерилизации

Чашки Петри, пробирки, пастеровские и градуированные пипетки стерилизовали сухим жаром при температуре 180°С соответственно 60 мин. Лабораторную посуду перед стерилизацией мыли и сушили. *Чашки Петри* по 5—10 штук заворачивали в крафт-бумагу или укладывали в специальные пеналы. *Пробирки* закрывали ватно-марлевыми пробками и так же, как чашки Петри, упаковывали в пакеты. *Пастеровские пипетки* заворачивали в бумагу по 5—15 штук, при этом надо соблюдать большую осторожность, чтобы не обломать запаянные концы капилляров. В верхнюю часть каждой пипетки вкладывали небольшой кусочек ваты, чтобы предупредить попадание материала в резиновый шланг, соединенный с грушей, в момент его насасывания. Во время работы пипетки из пакета вынимали за верхний конец. В верхнюю часть градуированных пипеток, как и в пастеровские пипетки, вставляли предохранительную вату и затем заворачивали в бумагу, предварительно нарезанную полосками шириной 2—2,5 см и длиной 50—70 см. На бумаге подписывали объем завернутой пипетки. При наличии металлических пеналов градуированные пипетки стерилизовали в них.

Подготовка к стерилизации бумаги, марли и ваты. *Вату, марлю, фильтровальную бумагу* стерилизовали в сухожаровой печи при температуре 160 °С в течение 2,5 ч от момента показания термометром данной температуры. Перед стерилизацией бумагу и марлю нарезали кусочками, вату сворачивали в виде шариков или тампонов нужной величины. После этого каждый вид материала в отдельности по одной или несколько штук заворачивали в крафт-бумагу.

### 2.2.2. Освоение техники посева клинического материала

1) При посеве в жидкую питательную среду петлю с находящимся на ней материалом погружают в среду. Если материал вязкий и с петли не снимается, его растирают на стенке сосуда, а затем смывают жидкой средой. Жидкий материал, набираемый в пастеровскую или градуированную пипетку, вливают в питательную среду.

2) При посеве на скошенный мясопептонный агар пробирку берут в левую руку между I и II пальцами, чтобы основание пробирки находилось на поверхности кисти руки и посев осуществлялся под контролем глаза. Пробку из пробирки вынимают правой рукой IV и V пальцами, не прикасаясь к той ее части, которая входит внутрь пробирки. Остальные три пальца правой руки остаются свободными для взятия бактериологической петли, посредством которой производится посев. Петлю держат, как пишущее перо. После вынимания пробки пробирку с питательной средой держат в наклонном положении во избежание попадания в нее посторонних микроорганизмов из воздуха.

При посеве на скошенный агар петлю с находящимся на ней пересеваемым материалом вводят в пробирку до дна, опускают плашмя на поверхность питательной среды и скользящими движениями наносят штрихи снизу-вверх от одной стенки пробирки к другой.

3) При посеве на поверхность плотной питательной среды из пробирки в чашки Петри пробирку фиксируют II, III и V пальцами левой

руки, а крышку чашки Петри приоткрывают I и IV пальцами левой руки настолько, чтобы в образовавшуюся щель свободно проходили петля или шпатель. Небольшое количество исследуемого материала, взятого из пробирки бактериологической петлей, втирают в поверхность питательной среды у края чашки. Затем петлю прожигают, чтобы уничтожить избыток находящегося на ней материала. Линию посева начинают с того места, в котором находится материал. Бактериологическую петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее поверхность, и проводят штрихи по всей среде или по секторам, разграфив предварительно дно чашки (при условии, что среда прозрачна) на 4, 8 или 16 равных частей. Нужно стараться, чтобы штрихи, наносимые петлей, располагались как можно ближе друг к другу, так как это удлиняет общую линию посева и дает возможность получить изолированные колонии микробов в концевой ее части.

- Для равномерного распределения засеваемого материала по поверхности плотной питательной среды можно пользоваться вместо петли тампоном или шпателем.

- При обилии в засеваемом материале микробов они растут в виде пленки, покрывающей всю поверхность питательной среды. Такой характер микробного роста получил название сплошного или газонного. Посев газоном производят, когда нужно получить большие количества микробной культуры одного вида.

- Для посева материала в толщу плотной питательной среды готовят взвесь в стерильной водопроводной воде или в изотоническом растворе. Набирают 0,1—1 мл взвеси в пипетку (в зависимости от степени предполагаемого микробного загрязнения) и выливают в пустую стерильную чашку Петри.

- Вслед за этим чашку заливают 15—20 мл мясопептонного агара, расплавленного и остуженного до температуры 40—45°C (при такой температуре пробирка со средой, приложенная к щеке, не должна

вызывать ощущения ожога). Для равномерного распределения исследуемого материала в питательной среде закрытую чашку с содержимым слегка вращают по поверхности стола.

- Посев уколом в столбик питательной среды производят в пробирку со средой, застывшей в виде столбика. Пробирку берут в левую руку как обычно, и в центре столбика до дна пробирки вкалывают петлю с находящимся на ней материалом.

- Калиброванной бактериологической петлей (диаметр 2 мм, емкость 0,005 мл) производят посев мочи на сектор А чашки Петри с простым агаром, сделав около 40 штрихов. Затем петлю прожигают и производят 4 штриховых посева из сектора А в сектор I, из сектора I в сектор II и из сектора II в сектор III, каждый раз после прожигания петли.

- Чашки инкубируют при температуре 37 °С в течение 18—24 ч, после чего подсчитывают количество колоний, выросших в разных секторах, и определяют количество бактерий в 1,0 мл.

### *2.2.3. Посев образцов клинического материала*

Посев мокроты производился в тех случаях, когда полученные образцы удовлетворяли известным цитологическим критериям при микроскопии нативного материала: более 25 полиморфно-ядерных лейкоцитов и больше 10 эпителиальных клеток в поле зрения при большом увеличении или менее 25 эпителиальных клеток - при малом увеличении [Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 N 535 "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических].

Посев содержимого мокроты осуществляли на твердые питательные среды: 5% кровяной агар, кровяно-сывороточный агар, желточно-солевой агар, агар с гретой кровью (шоколадный агар), среда Эндо, среда Сабуро (Приложение 1). Перед посевом на плоские питательные среды

проводилась гомогенизация мокроты с добавлением муколитика («Хай Медиа», Индия). Далее произвели семикратное разведение гомогенизированной мокроты (до  $10^{-7}$ ).

Разведения  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  рассеивали на чашки с кровавым агаром, шоколадным агаром и кровяно-сывороточным агаром. Чашки помещали в  $CO_2$ -инкубатор для создания анаэробных условий и инкубировали при  $37^\circ C$  в течение 24-48ч.

Из разведения  $10^{-1}$  делали посевы на селективные среды: желточно-солевой агар, среда Сабуро, среда Эндо и инкубировали при  $37^\circ C$  в течение 24-48ч.

Посев мочи проводился по методу Гольда на 5% кровавой агар и агар Сабуро. Инкубировали при  $37^\circ C$  в течение 24-48ч.

Посев раневого отделяемого проводили качественным методом на 5% кровавой агар и желточно-солевой агар (элективная среда для бактерий рода *Staphylococcus*).

Посев проводили на среды, предварительно пройденные контроль стерильности и контроль качества и подсушенные в термостате при  $37^\circ C$ .

Идентификацию бактерий проводили с помощью определений морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств микроорганизмов и масс-спектрометрии.

#### *2.2.4. Биохимические особенности неферментирующих грамотрицательных бактерий*

Для подтверждения принадлежности микроорганизмов к группе НФГОБ проводили:

- Тест на наличие цитохромоксидазы. На коммерческие тест полоски, пропитанные красителем п-фенилендиаминдигидрохлоридом, наносили исследуемую культуру, при участии оксидазы краситель окисляется и образует окрашенное вещество индофенол синий.



- OF - тест (oxidative - fermentative) для дифференциации анаэробного и аэробного пути расщепления углеводов, в условиях, способствующих слабому образованию кислоты. Культуру засеивали в 2 пробирки со средой Хью-Лейфсона уколом, одну из них заливали вазелиновым маслом. В пробирке без вазелинового масла наблюдали окисление, в пробирке с вазелиновым маслом – ферментацию (Приложение 2).

Видовую идентификацию проводили на масс-спектрометре («BioMerieux», Франция).

### **2.3. Микроскопия мазка (окраска по Граму)**

Для определения морфологии клеток и их тинкториальных свойств, а также выявления принадлежности бактерий к грамположительным или к грамотрицательным группам, из части исследуемой колонии готовили мазок и окрашивали по Граму (Набор для окраски по Граму, «Диахим», Санкт-Петербург). Необходимые реагенты: карболовый раствор генцианвиолета, раствор Люголя, раствор сафранина.

Подготовка к анализу:

- 1) Предметное стекло перед исследованием должно быть тщательно вымыто и обезжирено смесью для обезжиривания предметных стекол.

- 2) Перед использованием фуксин Циля разводят в 10 раз дистиллированной водой (из расчета – к 1 мл фуксина добавляют 9 мл дистиллированной воды).

Приготовление мазков:

- 1) На обезжиренное предметное стекло в каплю водопроводной воды внести бактериологической петлей небольшую часть материала с посева (чашка Петри или пробирка) соответствующей микробной тест-культуры и равномерно распределить материал в воде. С обратной стороны предметного стекла обозначить границы мазка с помощью маркера.

- 2) Просушить мазок на воздухе при комнатной температуре.

#### Фиксация мазков:

Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующим веществом на 10—15 минут и затем высушивают на воздухе, либо полученные мазки тщательно высушивают и затем фиксируют сухим жаром. Фиксация достигается посредством несильного нагревания (примерно до 70°C) предметного стекла, которое для этого трижды проводят над пламенем спиртовки мазком вверх в течение 5 секунд.

#### Методика окраски:

1. Поместить на мазок полоску фильтровальной бумаги и нанести на фиксированный мазок несколько капель (3-4 капли) карболового раствора генцианвиолета так, чтобы раствор полностью покрыл фильтровальную бумагу и выдержать 2-3 минуты;
2. Слить краску, удалить фильтровальную бумагу и сполоснуть мазок проточной водой в течение 30 секунд;
3. Нанести на мазок несколько капель (3-4 капли) раствора Люголя на 1-2 минуты;
4. Смыть краситель водопроводной водой в течение 10 секунд;
5. Поместить мазок в ёмкость с этиловым спиртом 96°, опуская и извлекая его до тех пор, пока мазок не обесцветится (30-60 секунд);
6. Промыть мазок в проточной воде в течение 1-2 минут;
7. Нанести на мазок несколько капель (3-4 капли) сафранина на 1-3 минуты;
8. Промыть стекла в проточной воде 1 минуту;
9. Высушить на воздухе в течение 5-10 минут;
10. Микроскопировать с иммерсией в световом микроскопе (увеличение x100, окуляр x10).

#### **2.4. Идентификация микроорганизмов группы НФГОб методом масс-спектрометрии**

Масс-спектрометрическое исследование проводилось с помощью анализатора микроорганизмов Vitek MS (BioMerieux, Франция) с использованием технологии MALDI TOF (матричная лазерная времяпролетная масс-спектрометрия). Экстракция белков осуществлялась непосредственно на одноразовом слайде с использованием готового матрикса VITEK MS-CHCA. Интерпретация результатов проводилась на базе VITEK MS, разработанной на платформе компании Anagnostes и состоящих из клинически значимых видов с использованием расширенного классификатора спектров. Каждый из 37 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных нами идентифицировали в одной постановке на масс-спектрометре. Постановка осуществлялась с суточными культурами, выросшими на 5% кровяном агаре.

Методика идентификации на Vitek MS (MALDI-TOF):

1 ЭТАП: Подготовка образца

Одноразовый слайд (рисунок 1) содержит 48 лунок для идентификации микроорганизмов. Условно общее количество (48 лунок) поделено на три части, в каждой из которых находится по 16 лунок. В каждую из дополнительных центральных лунок (общее количество 3) стерильной бактериальной петлей нанесли по одной колонии штамма *Escherichia coli* ATCC 25922 в качестве контроля достоверности идентификации масс-спектрометром. Перед началом и после идентификации интересующих исследователя микроорганизмов, масс-спектрометр детектирует микроорганизм центральной лунки (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Затем в каждую из 48 лунок на одноразовом слайде стерильной бактериальной петлей нанесли по одной колонии чистой суточной культуры *Pseudomonas aeruginosa*. Далее нанесли матрицу VITEK MS-CHCA (органическая 2',5' дигидроксibenзойная кислота), образующую при высыхании на воздухе кристаллы: происходит сокристаллизация - молекулы бактериальных белков оказываются включенными в толщу

кристаллов матрицы, что обеспечивает их дальнейшую ионизацию и масс-спектрометрический анализ.

Одновременно могут быть параллельно анализированы системой до 4 слайдов с 48 позициями на каждом (192 образца), что позволяет гибко тестировать как малые, так и крупные партии образцов.



Рисунок 1 – Одноразовый слайд масс-спектрометрии с нанесенной чистой культурой микроорганизма и матрицей VITEK MS-CHCA

## 2 ЭТАП: Идентификация

Образец помещают в прибор и подвергают воздействию наносекундных лазерных импульсов, при этом матрикс испаряется, а образец под действием электрического поля приобретает положительный заряд. Программное обеспечение прибора (Advanced Reporting Tool - bioART™) (рисунок 2) оценивает время пролета частиц с ускорением от источника ионизации к детектору и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Масс-спектр сравнивается со спектрами из базы данных и на основании сведений о массах происходит идентификация микроорганизмов. База данных состоит из более 950 клинически значимых видов (бактерий, дрожжей, плесневых грибов/дерматофитов, микобактерий) и более 25 000 спектров. Для каждого вида микроорганизмов в базе данных присутствуют спектры большого количества штаммов.

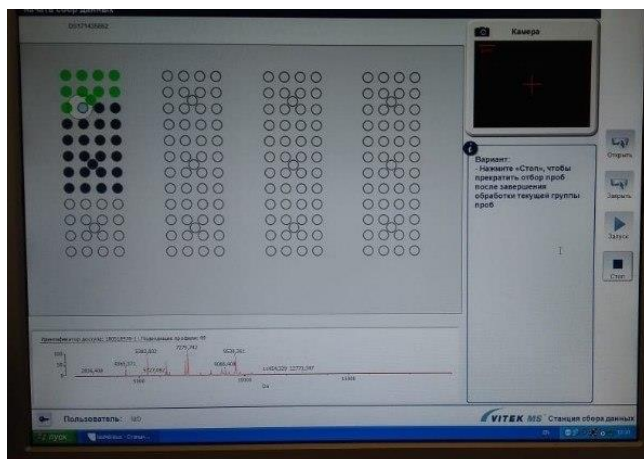


Рисунок 2 – Программное обеспечение VITEK MS (автоматический сбор и анализ данных)

## 2.5. Поиск и сравнительный анализ последовательностей ДНК-мишеней

Поиск генов патогенности и сравнительный анализ последовательностей ДНК-мишеней НФГОб проводился в международном банке нуклеотидных последовательностей GenBank.

Поиск заданной последовательности ДНК в GenBank:

1. Открыть в Интернете сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
2. В окошке Search открыть вкладку Nucleotide и ввести в поле название искомого микроорганизма, например, *Pseudomonas aeruginosa* и осуществить поиск.
3. Скопировать данную нуклеотидную последовательность в буфер обмена и вставить в окно программы EditSeq пакета Lasergene.
4. Сохранить файл.

Выравнивание и редактирование нуклеотидных последовательностей осуществлялось с использованием программы Meg-Align. Подбор олигонуклеотидных праймеров к специфическим консервативным последовательностям ДНК-мишеней проводилось с помощью пакета программ DNASar.

При подборе праймеров были соблюдены следующие условия:

1. Оптимальная длина праймера составляет от 18-30 нуклеотидов;
2. Праймер должен иметь уникальную последовательность, находящуюся внутри матричной ДНК, которую предполагается амплифицировать;
3. Праймеры не должны образовывать между собой стабильные димеры и не должны формировать шпилечные структуры;
4. Оптимальная температура отжига находится в диапазоне от 55°C до 70°C;
5. Различие температуры отжига между двумя праймерами должно быть минимально;

В идеале длина олигонуклеотидного праймера должна составлять не менее 20 нуклеотидов, на долю GC-состава отводится 50%.

Проверка на специфичность и чувствительность подобранных праймеров выполнялась с помощью ПЦР на чистых культурах.

Таблица 1

Последовательности праймеров, температуры отжига и размеры ожидаемых продуктов

Объект (GenBank)	Название праймера	5'-3' последовательность	Темп. отжига	Ожидаемый размер продукта (п.н.)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PsAerug21_F PsAerug21_R	F: aaggcgtgggtatcaaacag R: gggtaaggttcctcgcgtat	60°C	282
<i>Pseudomonas mendocina</i>	PsMen22_F PsMen22_R	F: aatgaagaaggccgaaaggt R: tcaagcagtacccaatgcag	62°C	256

## 2.6. Выделение ДНК неферментирующих грамотрицательных бактерий

Обработка клинического материала и выделение нуклеиновых кислот – первый и важнейший этап молекулярно-биологического исследования. Основной задачей данного этапа является получение очищенного препарата ДНК для последующей реакции амплификации. Клинический материал, используемый для исследования на возбудителей ИППП, сложная многокомпонентная система, которая содержит большое количество веществ – ингибиторов, подавляющих реакцию амплификации. От того насколько эффективно они будут удалены и/или инактивированы, зависит в конечном счете чувствительность всего теста.

Для получения ДНК неферментирующих грамотрицательных бактерий применяли метод выделения лизирующим раствором, с использованием набора реагентов «Лизирующий раствор» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), согласно рекомендации производителя.

Состав набора «Лизирующий раствор»: лизирующий раствор с ВКО – 200 пробирок по 0,5 мл; отрицательный контрольный образец (ОКО) – 2 флакона по 1 мл.

**Принцип метода.** Набор содержит комплект готовых для применения пробирок с расфасованным лизирующим раствором, который представляет собой многокомпонентный раствор, содержащий внутренний контроль (ВКО). После того, как биологическая проба доставляется в лабораторию, аликвота переносится в пробирку с лизирующим раствором. Прогрев пробы при 98 °С в лизирующем растворе приводит к лизису клеток, выходу ДНК в раствор. После этого проба готова к постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Было отобрано необходимое количество пробирок (37 клинических образцов *Pseudomonas aeruginosa*, ОКО и ПКО) для с лизирующим

раствором. Промаркировали пробирки в соответствие с клиническими образцами, установили их в штатив.

Предварительная подготовка анализируемых проб. Коротким центрифугированием необходимо сбросить капли со стенок пробирок с транспортным раствором, содержащим анализируемый материал. После центрифугирования аккуратным пипетированием ресуспендировать осадок из клеток, полученный в пробирке с транспортной средой, чтобы в выделение осадка попала суспензия клеток.

Выделение ДНК неферментирующих грамотрицательных бактерий включало в себя следующие манипуляции.

В пробирки, содержащие лизирующий раствор, внести по 100 мкл пробы, используя наконечники с аэрозольным барьером.

В пробирку положительного контроля внести 100 мкл ПКО. В пробирку отрицательного контроля внести 100 мкл ОКО.

Пробирки плотно закрыть крышками и защёлкнуть замочек на крышках.

Поместить пробирки в предварительно прогретый до 98 °С термошейкер и прогреть при 98 °С в течение 15 минут. После прогрева необходимо охладить пробирки до комнатной температуры (18-25) °С, затем перенести в центрифугу и центрифугировать при 8000 об/мин при температуре (18-25) °С в течение 1 минуты. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК, которую можно использовать для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Все использованные одноразовые материалы подвергнуть обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (в соответствие с МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке стерилизации изделий медицинского назначения»).

Полученные пробы можно хранить в течение 1 месяца, при условии хранения образцов в холодильнике при 4°С.



## 2.7. Определение чувствительности и специфичности подобранных последовательностей ДНК-мишеней

1) Приготовление инокулюма для определения специфичности и чувствительности выбранного праймера

Исходный инокулюм готовится по имеющемуся в лаборатории стандарту мутности или по спектрофотометру (нефелометру) с концентрацией  $10^8$  или  $10^9$  КОЕ/мл. Сравнение приготовленного инокулюма проводится с коммерческим стандартом МакФарланда (McFarland), который содержит латексные частицы, суспендированные в специальном буферном растворе в количестве, обеспечивающем прохождение волны света длиной 600-650 нм.

2) Определение специфичности

Специфичность задаётся нуклеотидной последовательностью специфических праймеров. Для определения специфичности выбранного праймера к ДНК-мишени исследуемых микроорганизмов используются музейные культуры микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 21853), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Escherichia coli* ATCC 25922).

3) Определение чувствительности

ПЦР позволяет выявлять микроорганизмы, присутствующие в клиническом материале в небольшом количестве (10–1000 клеток в пробе). Молекулярно-генетические методы оказываются эффективными, даже когда микроорганизмы присутствуют в крайне низкой концентрации, например, на ранних стадиях заболеваний или при исследованиях донорской крови и органов.

Для проверки степени чувствительности выбранного праймера из стандартизированной взвеси контрольного штамма исследуемого микроорганизма готовится рабочее разведение (1:10) на стерильном 0,9% физиологическом растворе.

Исходная взвесь готовится с концентрацией  $10^8 - 10^9$  КОЕ/мл, используя соответствующие стандарты мутности или нефелометры. Десятикратным разведением концентрация микроорганизмов доводится до необходимой для контроля (таблица 2). Титрование требует работы с дозирующими пипетками соответствующих объёмов. Точность приготовленного инокулюма зависит от точности титрования. На каждое разведение следует использовать отдельный наконечник с фильтром.

Таблица 2

Рабочее разведение (1:10) из стандартизированной взвеси контрольного штамма исследуемого микроорганизма на стерильном 0,9% физиологическом растворе

№ пробирки	Кол-во микробных клеток в 1мл взвеси	Кол-во раствора NaCl	Объем вносимой суспензии	Кол-во микробных клеток в 1мл взвеси
1	$10^0$	0мл	0,5мл из исходной взвеси	$10^9$
2	$10^{-1}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 1	$10^8$
3	$10^{-2}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 2	$10^7$
4	$10^{-3}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 3	$10^6$
5	$10^{-4}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 4	$10^5$
6	$10^{-5}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 5	$10^4$
7	$10^{-6}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 6	$10^3$
8	$10^{-7}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 7	$10^2$
9	$10^{-8}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 8	$10^1$
10	$10^{-9}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 10	10

В пробирку с ОКО добавляется 1мл 0,9% физического раствора без добавления исходной взвеси исследуемого микроорганизма, содержащим в 1 мл взвеси  $10^9$  микробных клеток.

В пробирку с ПКО добавляется 1мл исходной взвеси исследуемого микроорганизма, содержащим в 1 мл взвеси  $10^9$  микробных клеток.

## **2.8. ПЦР генов патогенности неферментирующих грамотрицательных бактерий**

Аmplификацию участков ДНК осуществляли с использованием стандартных наборов на амплификаторе «Терцик МС-2», «ДНК-технология» (г. Москва, Россия).

Для проведения полимеразной цепной реакции были использованы оригинальные праймеры, подобранные к генам патогенности неферментирующих грамотрицательных бактерий.

Расположить в штативе буфер Таq-полимеразы, раствор dNTP, растворы праймеров для разморозки. Затем ресуспендировать компоненты реакционной смеси на вортексе. Таq-полимеразу необходимо хранить в морозильнике, избегать долгого нахождения на рабочем месте без холодного штатива.

Перед использованием проводят разведение концентрированного праймера (концентрата) до рабочего раствора. Для разведения праймера PsAerug21 F 10,8 ОЕ/мл: в пробирку на 1,5 мл вносят 100 мкл праймера и 980 мкл высокоочищенной воды для инъекций (mQ), тщательно перемешивают на микроцентрифуге - вортекс. Для разведения праймера PsAerug21 R 12,7 ОЕ/мл: в пробирку на 1,5 мл вносят 100 мкл праймера и 1170 мкл высокоочищенной воды для инъекций (mQ), тщательно перемешивают на микроцентрифуге - вортекс. Рабочие растворы праймеров готовы к использованию.

Ход работы:

1. Расположить в штативе буфер Таq-полимеразы, dNTP, растворы праймеров для разморозки, затем ресуспендировать на вортексе. Таq-полимеразу необходимо хранить в морозильнике, избегать долгого нахождения на рабочем месте без холодного штатива.

2. Отобрать пинцетом необходимое количество одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 0,6 мл, промаркировать и расставить в штатив соответствующим образом.

3. Приготовить амплификационную смесь для общего количества анализируемых проб в пробирке на 1,5 мл и разлить по 22 мкл в каждую пробирку для амплификации на 0,6 мл.

Состав реакционной смеси для 1 пробирки:

- Высокоочищенная вода для инъекций (mQ) – 14,5 мкл;
- 10 × Taq – буфер – 2,5 мкл;
- Раствор dNTP – 2,5 мкл;
- Праймер PsAerug21 F – 1 мкл;
- Праймер PsAerug21 R – 1 мкл;
- Taq-полимераза – 0,5 мкл;

4. В каждую пробирку внести по 3 мкл ДНК исследуемого образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.

5. Во избежание испарения жидкости на поверхность каждой реакционной смеси наслаиваем 1 каплю минерального масла.

6. Пробирки закрыть, центрифугировать 5 с при 3000 об/мин на микроцентрифуге-вортекс.

7. Перенести пробирки в прогретый до 94°C амплификатор.

8. На ДНК-амплификаторе запустить необходимую программу со следующими параметрами:

	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °C	1 мин	1
Денатурация	95 °C	30 сек	30
Отжиг	60 °C	40 сек	
Элонгация	72 °C	20 сек	
Финальное удлинение	72 °C	2 мин	1
Хранение	10 °C	пауза	

## 2.9. Детекция продуктов ПЦР-амплификации методом агарозного гель-электрофореза

Метод агарозного гель-электрофореза заключается в визуализации результатов в пластине агарозного геля, который представляет собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, например, бромистого этидия.

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР в агарозном геле осуществляли с использованием стандартных наборов на сертифицированном оборудовании (Биоком, г. Москва) в 1,7% горизонтальном агарозном геле.

Для электрофореза использовались камера «SE-2» («Хеликон», Россия) и источник питания «Эльф-4» («ДНК-Технология», Россия) при оптимальной напряженности электрического поля 10 В/см.

Детекцию результатов проводили путем окрашивания агарозного геля бромистым этидием с последующей визуализацией при освещении УФ на трансиллюминаторе «УВТ-1» (Биоком, Россия). Документирование результатов проводили с использованием цифровой видеокамеры «Mitron» и программы «Biotex-D» (Биоком, Россия).

Агарозный гель-электрофорез проводили по следующей схеме:

1. Приготовить 1 л 2х-ного ТАЕ буфера путем разбавления 50х-ного ТАЕ буфера в дистиллированной воде. К 20 мл 50х-ного ТАЕ буфера добавить 980 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешать.

2. Взвесить 1,7 г агарозы и добавить 2 мл 50х-ного ТАЕ буфера, перемешать и расплавить смесь в микроволновой печи в течение 2-3 минут. Периодически помешивать. Довести до кипения, но не допускать кипения более 10 секунд. Смесь в колбе должна стать прозрачного цвета.

3. Разлить агарозу на ровной поверхности в специальную форму (заливка) с одной или двумя пластиковыми гребенками, при этом толщина

геля не должна быть менее 2 мм и не более 5 мм. Гель полностью застывает и может быть использован после 15-20 минут.

4. Налить в камеру для электрофореза необходимое количество 2х-ного ТАЕ буфера, поместить в него застывший гель. Буфер должен полностью покрывать гель сверху на 2-10 мм.

5. Медленно нанести автоматической пипеткой пробу ДНК с красителем в лунку геля в последовательности, соответствующей нумерации проб. Благодаря глицерину раствор ДНК не будет всплывать из лунки.

6. Нанести автоматической пипеткой отрицательный контроль и маркерную лестницу в отдельные лунки.

7. Подключить клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (-) находился на старте, а (+) – на финише.

8. Запустить электрофорез при помощи источника питания (Эльф-4, ДНК-Технология) при следующих параметрах: сила тока 400 мА, мощность 80Вт, напряжение 120 В. На старте пузырей должно быть больше, чем на финише. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя.

9. Электрофорез проводить в течение 20-50 минут, затем вынуть гель из формы и поместить в кювету для окрашивания. Налить в кювету слабый раствор бромистого этидия. Окрашивать в течение 5-7 мин.

10. Слить краситель в колбу. Промыть гель проточной водой. Поместить его на стекло УФ-транслюминатора. Включить транслюминатор и проанализировать результаты анализа. Сфотографировать гель при помощи цифрового фотоаппарата. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

## ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Выделение клинических штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий

По данным бактериологической лаборатории Клиники БГМУ, за 2017 год рутинным методом было исследовано 39913 проб различного клинического материала (рисунок 3). Выделено 16880 клинических штаммов микроорганизмов, из которых неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы составили 366 штаммов (2,1%) (рисунок 4). *Pseudomonas aeruginosa* составила 152 штамма (0,9%). *Pseudomonas mendocina* составила 6 культур (0,03%).

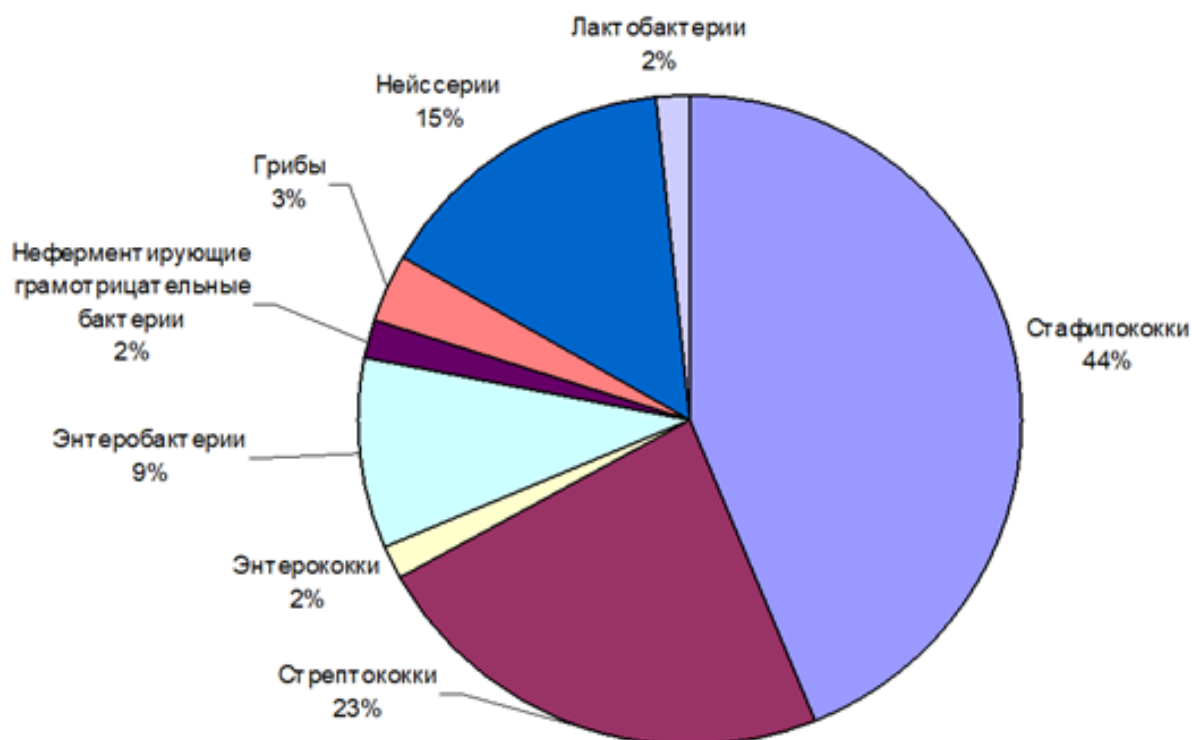


Рисунок 3 – Структура выделенных микроорганизмов в 2017 году в клинике БГМУ

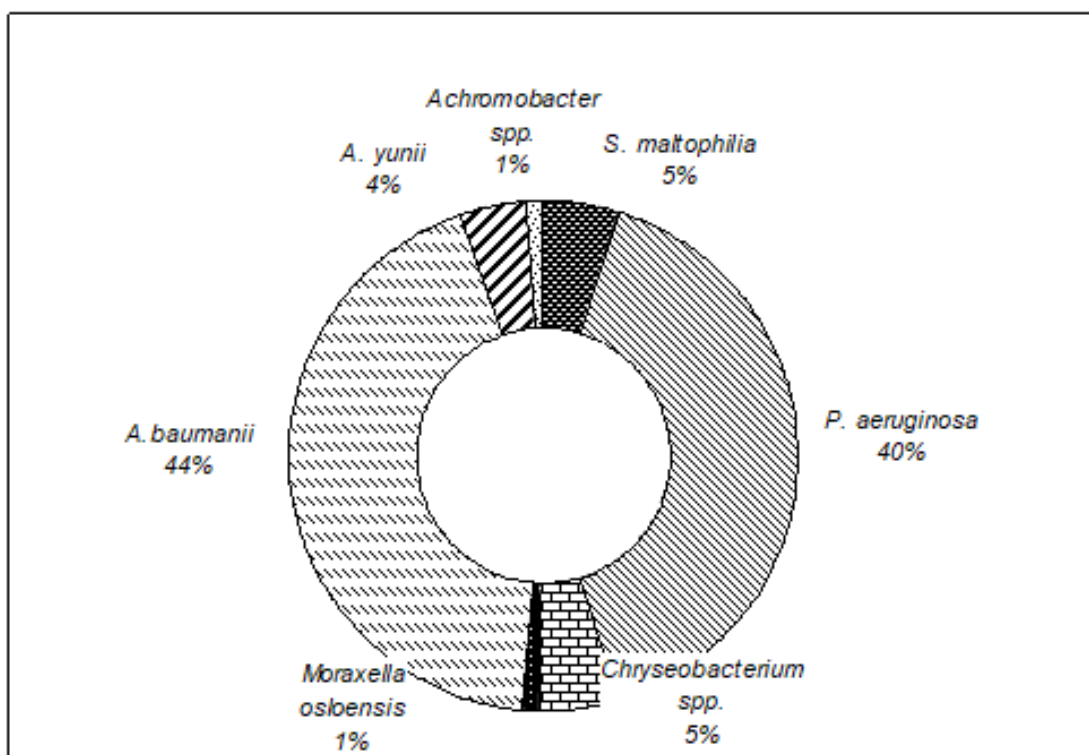


Рисунок 4 – Видовой состав НФГОВ, выделенных в многопрофильном стационаре в 2017 году и идентифицированных при использовании MALDI-TOF масс-спектрометрии

В результате проведенных исследований установлено, что по частоте встречаемости доминировали *Pseudomonas aeruginosa* (40%) и *Acinetobacter* spp. (44%). Соотношение неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов статистически значимы ( $\chi^2$  крит. = 21,55,  $p < 0,01$ ).

При этом отмечена тенденция к увеличению количества случаев выявления микроорганизмов, ранее остававшихся нераспознанными: *Pseudomonas oleovorans*, *Chryseobacterium* spp., *Acinetobacter yunii*, *Moraxella osloensis*, *Achromobacter* spp. и некоторые другие.

Наиболее часто НФГОВ на протяжении рассматриваемого периода выделялись из отделяемого слизистых верхних дыхательных путей и мокроты детей, госпитализированных с различными диагнозами (134 штамма из 7902 по данным Клиники БГМУ) (рисунок 5).



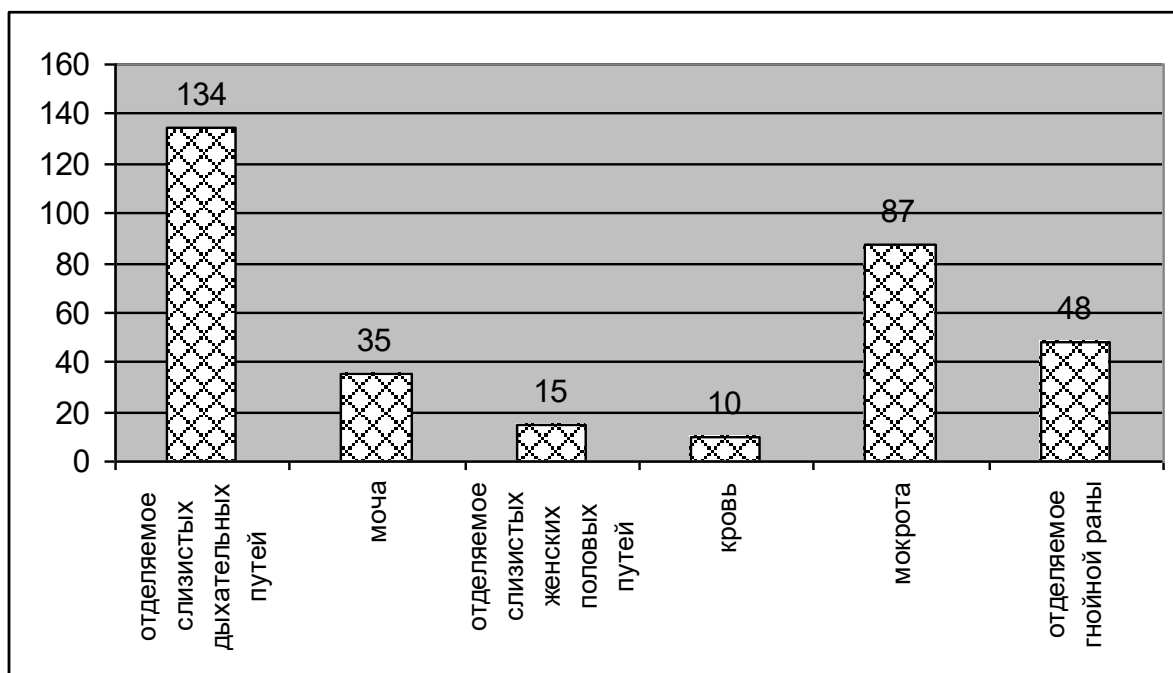


Рисунок 5 – Количество культур неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных в 2017 году из различных клинических образцов

### 3.2. Бактериологический посев

*Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas mendocina* на плотных питательных средах культуры дают крупные слизистые колонии, иногда с гемолизом и металлическим блеском. На жидких питательных средах характерно равномерное помутнение и бархатистая пленка на поверхности. Характерной особенностью *P. aeruginosa* является пигментообразование. Признак пигментообразования непостоянен, встречаются и бесцветные штаммы микроорганизма. Культура *Pseudomonas aeruginosa* имеет характерный цветочный запах, напоминающий запах жасмина или земляничного мыла; бесцветные штаммы издают неприятный аммиачный запах (рисунок 6).

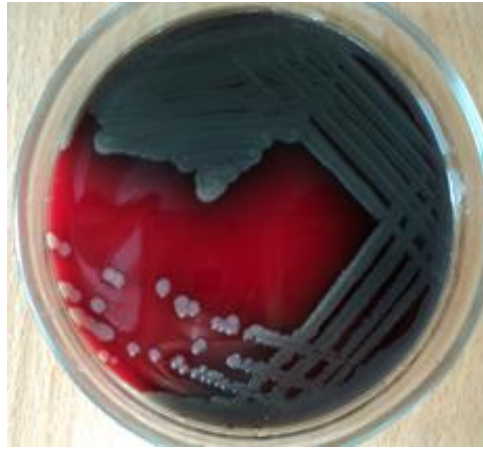


Рисунок 6 – Образование характерных колоний *Pseudomonas aeruginosa* на 5% кровяном агаре



Рисунок 7 – Образование характерных колоний *Pseudomonas mendocina* на 5% кровяном агаре



Рисунок 8 – Проявление пигмента *Pseudomonas aeruginosa* на скошенном мясо-пептонном агаре

### 3.3. Микроскопия мазка (окраска по Граму)

Для определения морфологии клеток и их тинкториальных свойств, а также выявления принадлежности бактерий к грамположительным или к грамотрицательным группам, из части исследуемой колонии готовили мазок и окрашивали по Граму.

При просмотре мазков, окрашенных по Граму, были выявлены мелкие грамотрицательные палочки размером 1,5-3,0 x 0,4-0,6 мкм, располагающиеся одиночно, парами или короткими цепочками, не образующими спор, но продуцирующие слизь, окружающую микробную клетку тонким слоем (рисунок 9, 10).

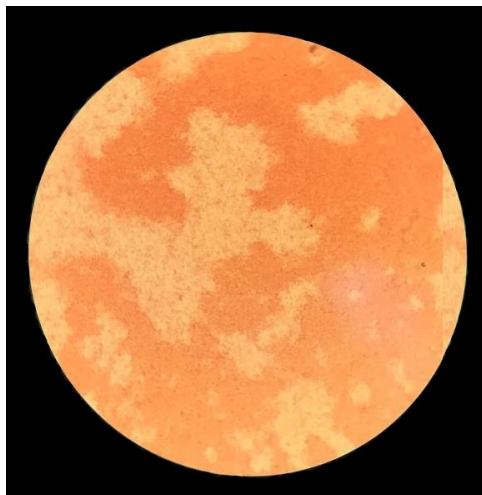


Рисунок 9 – Мазок исследуемой колонии бактерий *Pseudomonas aeruginosa*; грамотрицательные палочки. Микромед С-1. Ув. 100 x 10

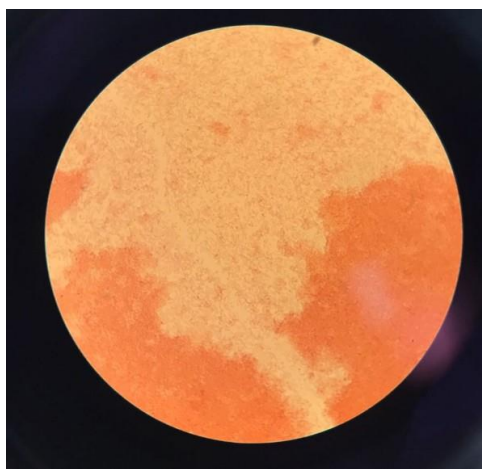


Рисунок 10 – Мазок исследуемой колонии бактерий *Pseudomonas mendocina*; грамотрицательные палочки. Микромед С-1. Ув. 100 x 10

### 3.4. Идентификация микроорганизмов группы НФГОБ на MALDI-TOF масс-спектрометре

Чистые культуры клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (152 штамма), выделенные за 2017 год из различного клинического материала (мокрота, моча, раневое отделяемое), были исследованы на масс-спектрометре (рисунок 11).

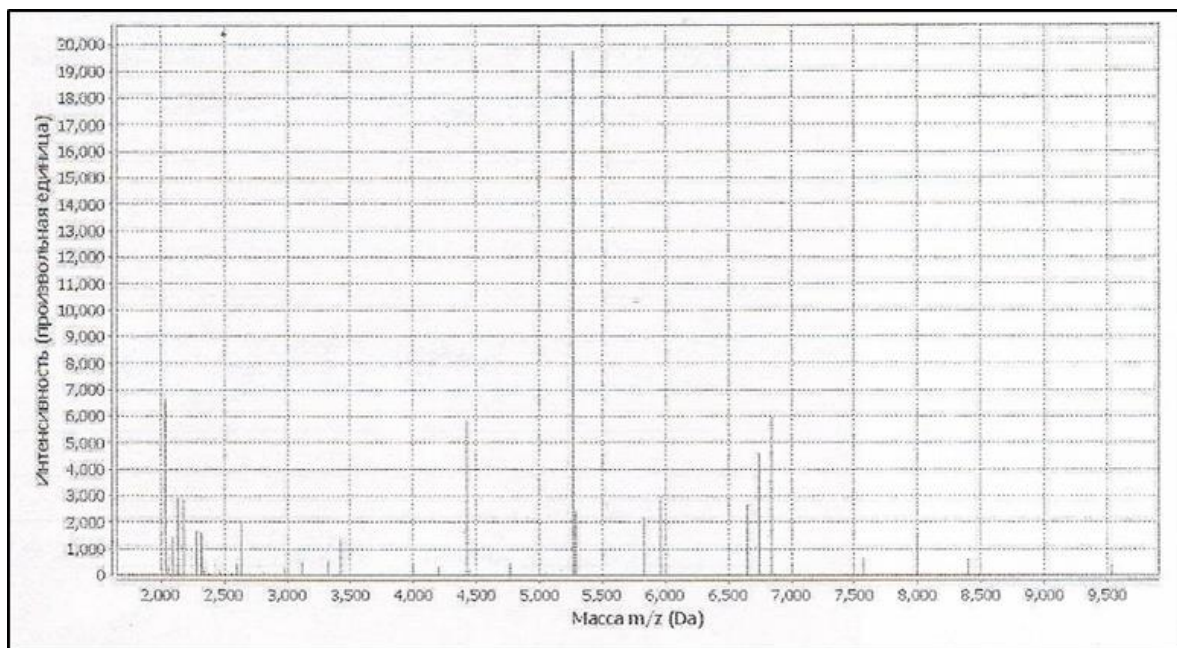


Рисунок 11 – Масс-спектр *Pseudomonas aeruginosa*. VITEK MS MALDI-TOF (BioMérieux, Франция)

Чистые культуры клинических штаммов *Pseudomonas mendocina* (6 штаммов), выделенные за 2017 год из различного клинического материала (мокрота, моча, раневое отделяемое), были исследованы на масс-спектрометре (рисунок 12).

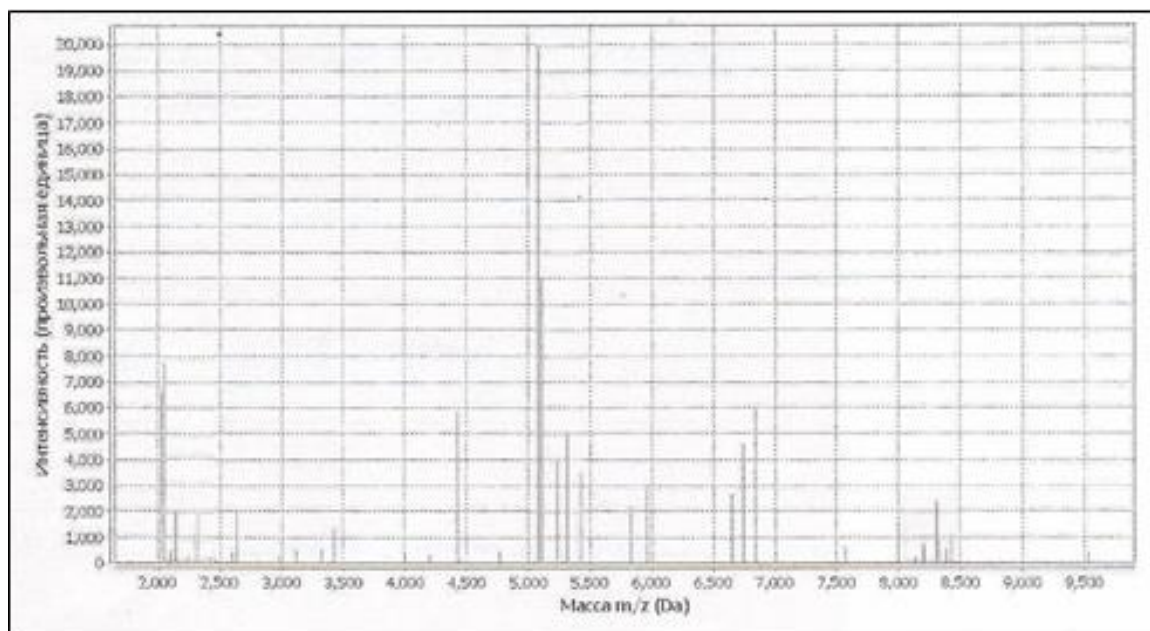


Рисунок 12 – Масс-спектр *Pseudomonas mendocina*. VITEK MS MALDI-TOF (BioMerieux, Франция)

Для дальнейшей работы были отобраны 37 культур *Pseudomonas aeruginosa* и 6 культур *Pseudomonas mendocina*.

### 3.5. Определение антибиотикорезистентности неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов

#### 3.5.1. Антибиотикорезистентность штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

Непрерывно изменяющийся спектр антибиотикорезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* обуславливает необходимость внедрения в практику системы непрерывного мониторингования указанных параметров. По результатам определения антибиотикочувствительности идентифицируемых микроорганизмов на автоматическом бактериологическом анализаторе Vitek 2 Compact («BioMerieux», Франция), наибольшую чувствительность штаммы *P. aeruginosa* имеют к полимиксину В (95%). Устойчивость к этому антибиотику встречается крайне редко среди возбудителей нозокомиальных инфекций. Антибактериальные препараты в порядке возрастания чувствительных к ним штаммов *P. aeruginosa*: цефепим (95% устойчивых штаммов)> цефоперазон (94%)> цефотаксим (87%)> цефтазидим (86%)>

пиперациллин (76%)> амикацин (51%)> тобрамицин (48%)> полимиксин (5%). При сравнении культур, выделенных из разных локусов, например, урокультуры и культуры, выделенные из мокроты и слизистых верхних дыхательных путей, показана большая устойчивость в последнем случае.

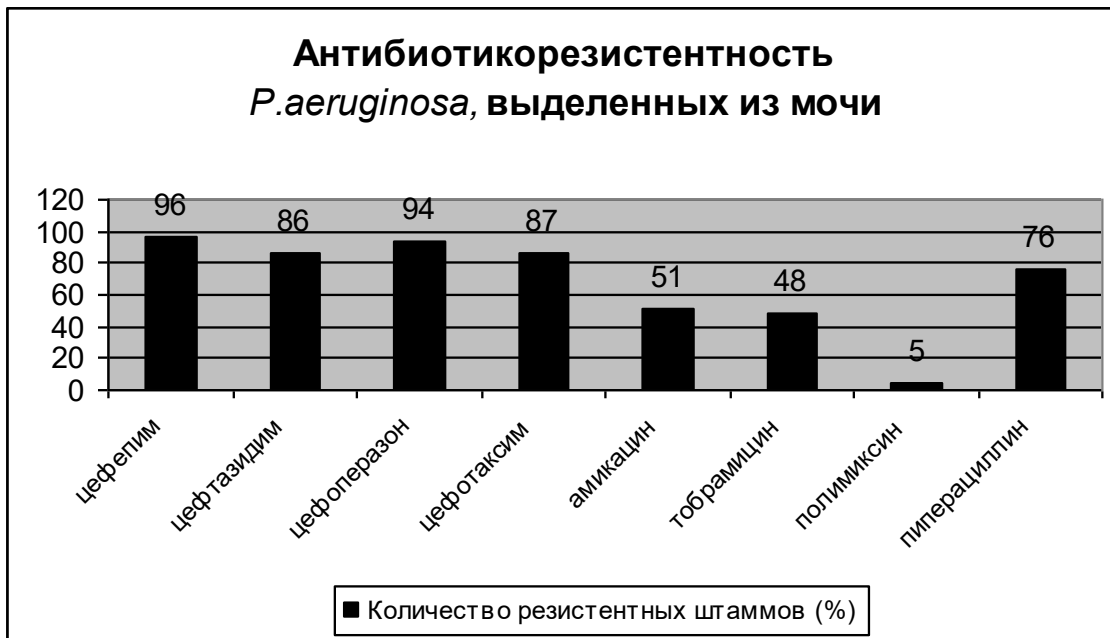


Рисунок 13 – Частота встречаемости антибиотикорезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из мочи за 2017 год



Рисунок 14 – Частота встречаемости антибиотикорезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из мокроты за 2017 год

### 3.5.2. Антибиотикорезистентность штаммов *Pseudomonas mendocina*

Исследование антибиотикорезистентности *Pseudomonas mendocina* показало, что бактерии относительно восприимчивы к ампициллину и цефалоспорином первого поколения, и абсолютно чувствительны к цефалоспорином третьего поколения (цефотаксим, цефотаксим, цефтриаксон, цефоперазон, цефтизоксим).

Аминогликозиды II поколения (гентамицин, тобрамицин) также активны в отношении неферментирующих грамотрицательных бактерий (*P. mendocina*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Acinetobacter spp*).

## 3.6. Определение специфичности и чувствительности праймера PsAerug21

### 3.6.1. Определение специфичности

В качестве контроля качества использовали исходную взвесь *Pseudomonas aeruginosa*, содержащим в 1 мл взвеси  $10^9$  микробных клеток.

Таблица 3

Соответствие номера пробирки и содержимого для определения специфичности праймера PsAerug21

№ пробирки	Культура микроорганизма
ПКО	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
ОКО	0,9% физиологический раствор
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>P. mendocina</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i> (штамм, идентифицированный на VITEK MS MALDI-TOF)

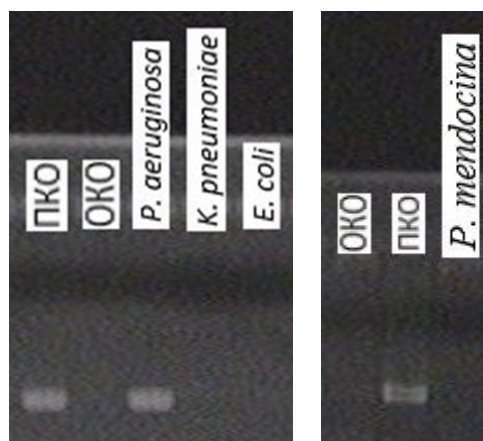


Рисунок 15 – Определение специфичности праймера, подобранного к гену *toxA* экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa*

### 3.6.2. Определение чувствительности

Исходная взвесь, содержащая концентрацию микроорганизмов  $10^8$  –  $10^9$  КОЕ/мл, была приготовлена с использованием соответствующих стандартов мутности (стандарт МакФарланда (McFarland)). Стерильным 0,9% физиологическим раствором исходная концентрация ( $10^9$ ) микроорганизмов десятикратным разведением (1:10) была доведена до необходимой для контроля. Титрование проводили с помощью дозирующих пипеток соответствующих объёмов. На каждое разведение был использован отдельный наконечник с фильтром.



Таблица 4

Рабочее разведение (1:10) из стандартизированной взвеси контрольного штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 на стерильном 0,9% физиологическом растворе

№ пробирки	Кол-во микробных клеток в 1мл взвеси	Кол-во раствора NaCl	Объем вносимой суспензии	Кол-во микробных клеток в 1мл взвеси
1	$10^0$	10мл	0,5мл из исходной взвеси	$10^9$
2	$10^{-1}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 1	$10^8$
3	$10^{-2}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 2	$10^7$
4	$10^{-3}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 3	$10^6$
5	$10^{-4}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 4	$10^5$
6	$10^{-5}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 5	$10^4$
7	$10^{-6}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 6	$10^3$
8	$10^{-7}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 7	$10^2$
9	$10^{-8}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 8	$10^1$
10	$10^{-9}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 10	10

В пробирку с ОКО добавили 1мл 0,9% физического раствора без добавления исходной взвеси *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

В пробирку с ПКО добавили 1мл исходной взвеси *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, содержащим в 1 мл взвеси  $10^9$  микробных клеток.



Рисунок 16 – Определение чувствительности праймера, подобранного к гену *toxA* экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa*

### 3.7. Детекция результатов амплификации гена *toxA* в геноме штаммов *P. aeruginosa*

Методом классической ПЦР с использованием пары подобранных праймеров PsAer21 была проведена идентификация 37 образцов чистой культуры *Pseudomonas aeruginosa*. В результате детекции продуктов амплификации ген *toxA* был обнаружен в 32 образцах (рисунок 17).

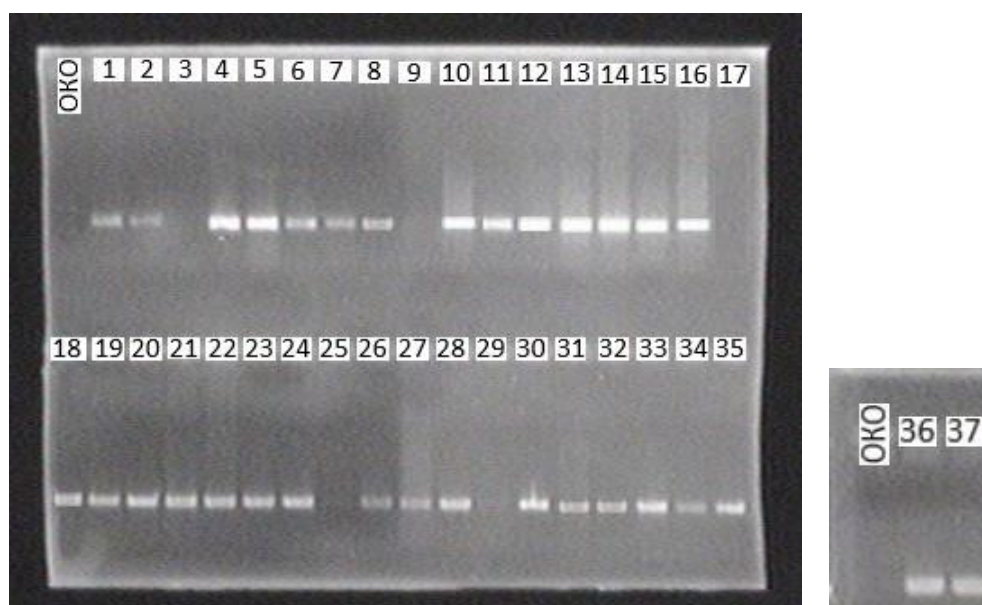


Рисунок 17 – Результаты электрофоретического анализа ПЦР-продуктов на наличия гена *toxA* в геномах чистых культур *P. aeruginosa* при использовании пары праймеров PsAer21

### 3.8. Определение специфичности и чувствительности праймера PsMen22

#### 3.8.1. Определение специфичности

Специфичность задаётся нуклеотидной последовательностью специфических праймеров. В качестве контроля качества использовали исходную взвесь *Pseudomonas mendocina* (штамм, идентифицированный на

VITEK MS MALDI-TOF), содержащим в 1 мл взвеси  $10^9$  микробных клеток.

Соответствие № пробирки и содержимого для определения специфичности праймера PsMen22

№ пробирки	Культура микроорганизма
ОКО	0,9% физиологический раствор
<i>P. mendocina</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i> (штамм, идентифицированный на VITEK MS MALDI-TOF)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853



Рисунок 18 – Определение специфичности праймера, подобранного к гену *rmpA\_4277* семейства белков MVIN *Pseudomonas mendocina*

### 3.8.2. Определение чувствительности

Исходная взвесь, содержащая концентрацию микроорганизмов  $10^8$  –  $10^9$  КОЕ/мл, была приготовлена с использованием соответствующих стандартов мутности (стандарт МакФарланда (McFarland)). Стерильным 0,9% физиологическим раствором исходная концентрация ( $10^9$ ) микроорганизмов десятикратным разведением (1:10) была доведена до необходимой для контроля. Титрование проводили с помощью дозирующих пипеток соответствующих объёмов. На каждое разведение был использован отдельный наконечник с фильтром.

Таблица 6

Рабочее разведение (1:10) из стандартизированной взвеси контрольного штамма *Pseudomonas mendocina* (штамм, идентифицированный на VITEK MS MALDI-TOF) на стерильном 0,9% физиологическом растворе

№ пробирки	Кол-во микробных клеток в 1мл взвеси	Кол-во раствора NaCl	Объем вносимой суспензии	Кол-во микробных клеток в 1мл взвеси
1	$10^0$	10мл	0,5мл из исходной взвеси	$10^9$
2	$10^{-1}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 1	$10^8$
3	$10^{-2}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 2	$10^7$
4	$10^{-3}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 3	$10^6$
5	$10^{-4}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 4	$10^5$
6	$10^{-5}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 5	$10^4$
7	$10^{-6}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 6	$10^3$
8	$10^{-7}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 7	$10^2$
9	$10^{-8}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 8	$10^1$
10	$10^{-9}$	0,9мл	0,1мл из пробирки 10	10

В пробирку с ОКО добавили 1мл 0,9% физического раствора без добавления исходной взвеси *Pseudomonas mendocina* (штамм, идентифицированный на VITEK MS MALDI-TOF).

В пробирку ПКО добавили 1мл исходной взвеси *Pseudomonas mendocina* (штамм, идентифицированный на VITEK MS MALDI-TOF), содержащим в 1 мл взвеси  $10^9$  микробных клеток.

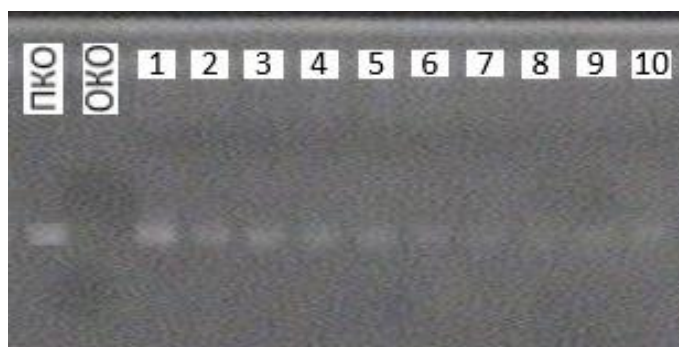


Рисунок 19 – Определение чувствительности праймера, подобранного к гену *rmen\_4277* семейства белков MVIN *Pseudomonas mendocina*

### 3.9. Детекция результатов амплификации гена *rmen\_4277* в геноме штаммов *P. mendocina*

Методом классической ПЦР с использованием пары подобранных праймеров PsMen22 была проведена идентификация 6 образцов чистой культуры *Pseudomonas mendocina*. В результате детекции продуктов амплификации ген *rmen\_4277* был обнаружен в 5 образцах (рисунок 20).



Рисунок 20 – Результаты электрофоретического анализа ПЦР-продуктов на наличия гена *rmen\_4277* в геномах чистых культур *P. mendocina* при использовании пары праймеров PsMen22.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

*Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas mendocina* - условно-патогенные микроорганизмы, относящиеся к группе неферментирующих грамотрицательных бактерий. Частота выделения *P. aeruginosa* среди неферментирующих бактерий в лечебных учреждениях составляет в среднем 13,4% (Бисенова и др., 2016). *P. mendocina*, в свою очередь, редко встречается в медицинской практике, тем не менее, в литературе описаны случаи, в которых бактерия являлась причиной инфицирования эндокардита (Nseir et al, 2011). Стоит отметить, что представители рода *Pseudomonas* с высокой долей вероятности выявляются в клиническом материале от больных с внутрибольничной инфекцией, что обусловлено физиологической устойчивостью возбудителей.

Ранней диагностике и своевременному назначению адекватной антибиотикотерапии препятствует сложность идентификации микроорганизмов группы НФГОБ. Учитывая тот факт, что бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas mendocina* могут присутствовать у здорового человека не вызывая заболевания, необходимо не только идентифицировать возбудителя в клиническом материале, но и оценить его вирулентность. Вместо рутинного метода бактериологического посева на питательные среды, для идентификации бактерий рода *Pseudomonas* был использован метод MALDI-TOF масс-спектрометрии. В качестве оценки вирулентности возбудителей был использован метод классической ПЦР, позволяющий обнаружить в геноме бактерий нуклеотидные последовательности, кодирующие патогенные для микроорганизма токсины.

За 2017 год в бактериологической лаборатории Клиники БГМУ выделено 16880 клинических штаммов микроорганизмов, из которых неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы составили 366 штаммов (2,1%).

Бактериологический посев исследуемого клинического материала (мокрота, моча, раневое отделяемое) осуществлялся на первичные, селективные и дифференциально-диагностические среды с целью последующего выделения чистой культуры возбудителя. По рекомендации производителя Vitek MS («BioMérieux», Франция), для идентификации микроорганизмов на масс-спектрометре Vitek MS (MALDI-TOF) («BioMérieux», Франция) предварительно были выделены чистые культуры *Pseudomonas aeruginosa* (152 клинических штамма) и *Pseudomonas mendocina* (6 клинических штамма) из каждого образца клинического материала на 5% кровяном агаре и мясо-пептонном агаре.

В результате идентификации выделенных чистых культур микроорганизмов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на автоматическом анализаторе Vitek MS («BioMérieux», Франция) была определена принадлежность 152 штамма (0,9%) к *Pseudomonas aeruginosa* и 6 (0,03%) штаммов к *Pseudomonas mendocina*. Для дальнейших исследований было отобрано 37 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и 6 штаммов *Pseudomonas mendocina*.

Определение антибиотикочувствительности идентифицируемых культур проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе Vitek 2 Compact («BioMérieux», Франция). Штаммы *P. aeruginosa* чувствительны к следующим антибактериальным препаратам: цефепим (95% устойчивых штаммов) > цефоперазон (94%) > цефотаксим (87%) > цефтазидим (86%) > пиперациллин (76%) > амикацин (51%) > тобрамицин (48%) > полимиксин (5%). Исследование антибиотикорезистентности *Pseudomonas mendocina* показало, что бактерии относительно восприимчивы к ампициллину и цефалоспорином первого поколения, и абсолютно чувствительны к цефалоспорином третьего поколения (цефотаксим, цефотаксим, цефтриаксон, цефоперазон, цефтизоксим).

Для проведения молекулярно-генетической идентификации проводился поиск генов патогенности и сравнительный анализ



последовательностей ДНК-мишеней НФГОБ в международном банке нуклеотидных последовательностей GenBank. В качестве гена патогенности *Pseudomonas aeruginosa* был выбран ген *toxA*, отвечающий за синтез экзотоксина патогенной бактерии. По литературным данным, более 80% клинических изолятов *P. aeruginosa* продуцируют экзотоксин А и до 27% штаммов, выделенных из окружающей среды (Diaz et al, 2011). Цитотоксическое действие экзотоксина А заключается в подавлении синтеза белка в чувствительных клетках. У пациентов, которые были инфицированы *Pseudomonas aeruginosa*, выявляют в сыворотке крови высокие титры антител против экзотоксина А (Sato, Frank, 2011). Исходя из этого можно сделать вывод, что экзотоксину А условно-патогенной палочки отведена ключевая роль в определении этиологии возбудителя.

По литературным данным, *Pseudomonas mendocina* обладает менее выраженной вирулентностью, по сравнению с *P. aeruginosa* (Suel et al, 2011). Этиологическая значимость бактерий во многом определяется узким спектром продуцируемых патогенных для макроорганизма токсинов. Детекция продуктов амплификации *P. mendocina* с праймером PsAerug21 к гену *toxA* выявила отрицательный результат. Исходя из чего можно сделать вывод, что клинические штаммы условно-патогенной бактерии с высокой долей вероятности не продуцируют экзотоксин А. В качестве патогенных белков, определяющих вирулентность бактерии, были выбраны интегральные белки семейства MviN (ген *pmen\_4277*). По литературным данным, белки семейства MviN выступают у некоторых бактерий в качестве фактора, ответственного за переход липида II через цитоплазматическую мембрану (Tyler et al, 2010).

Подбор олигонуклеотидных праймеров PsAerug21 и PsMen22 к специфическим консервативным последовательностям ДНК-мишеней (соответственно, ген *toxA* экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa* и ген *pmen\_4277 Pseudomonas mendocina*) был проведен с помощью пакета программ DNASar.

Проверка подобранных праймеров на специфичность и чувствительность к определенной последовательности ДНК в геноме исследуемых микроорганизмов выполнялась с помощью ПЦР на музейных культурах *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Методом молекулярной генетики (классическая ПЦР) ген *toxA* экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa* был обнаружен в 32 образцах (85,6%), гена *rten\_4277* семейства белков MVIN *Pseudomonas mendocina* в 5 образцах (83,3%). Среди штаммов, выделенных от больных, с высокой долей вероятности (83-85%) выявляются именно штаммы, имеющие в своем геноме нуклеотидные последовательности, кодирующие синтез токсичных белки (экзотоксин А у *Pseudomonas aeruginosa* и белки семейства MVIN у *Pseudomonas mendocina*). Исходя из чего можно сделать вывод, что степень вирулентности исследуемых бактерий во многом определяется продуцируемыми токсинами.

Сопоставление результатов идентификации *Pseudomonas aeruginosa* методом MALDI-TOF и обнаружения патогенного гена *toxA* методом классической ПЦР статистически не значимо ( $\phi$  крит. = 0.02706,  $p < 0,05$ ); связь между факторным и результативным признаками статистически значима ( $p = 0.302$ ,  $p < 0.05$ ).

Сопоставление результатов идентификации *Pseudomonas mendocina* методом MALDI-TOF и обнаружения патогенного гена *rten\_4277* статистически значимо ( $\phi$  крит. = 0.50000,  $p < 0,05$ ); связь между факторным и результативным признаками статистически не значима ( $p = 0.297$ ,  $p < 0.05$ ).

## ВЫВОДЫ

1. Было выделено 152 штамма чистой культуры *Pseudomonas aeruginosa* и 6 штаммов чистой культуры *Pseudomonas mendocina*;
2. Методом MALDI-TOF MS на автоматическом анализаторе Vitek MS («BioMerieux», Франция) 152 штамма были идентифицированы как *Pseudomonas aeruginosa*, 6 штаммов - как *Pseudomonas mendocina*;
3. Для оценки этиологической значимости микроорганизмов были подобраны специфические олигонуклеотидные праймеры PsAerug21 и PsMen22 к генам патогенности возбудителей (ген *toxA* у *Pseudomonas aeruginosa*, ген *pmen\_4277* у *Pseudomonas mendocina*);
4. Методом молекулярной детекции у 32 штаммов (85,6%) *Pseudomonas aeruginosa* был обнаружен патогенный ген *toxA*, у 5 штаммов (83,3%) *Pseudomonas mendocina* - ген *pmen\_4277*.
5. Ускоренная идентификация методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и точное обнаружение факторов патогенности возбудителя может стать основой для ранней диагностики, назначения адекватной антибиотикотерапии, мониторинга и прогнозирования течения бактериальных инфекций.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Белокрысенко, С.С. Выделение и сравнительная оценка методов идентификации клинических штаммов *Stenotrophomonas maltophi* / С.С. Белокрысенко, А. Дадха Теграни // Клини. Лаб. Диагностика. – 2004. - № 6. – С. 37-38.
2. Бережанский, Б.В. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока /Б.В. Бережанский, А.А. Жевнерев // Клини. антибиол. антимикроб. химиотер. – 2006. – Т. 8, № 3. – С. 130-144.
3. Бисенова Н.М., Ергалиева А.С., Митус Н.М. Резистентность грамотрицательных бактерий в отделении реанимации // Журнал Клиническая медицина Казахстана – 2016. – Т. 4, № 42. – С. 46-51.
4. Гельфанд, Б.Р. Этиологическая и нозологическая структура госпитальных инфекций в отделении реанимации хирургического профиля / Б.Р. Гельфанд, Б.З. Белоцерковский, Т.В. Попов // Инфекции в хирургии. – 2003. – Т. 1, № 4. – С. 2-10.
5. Зубков, М.Н. Диагностика и антимикробная терапия катетер-ассоциированных инфекций кровотока / М.Н. Зубков // Хирургия. – 2008. –№ 1. – С. 18-22.
6. Зубков, М.Н. Неферментирующие бактерии: классификация, общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas spp.* и исходных микроорганизмов / М.Н. Зубков // Инф. антимикроб. тер. – 2003. – Т. 5, № 1. – С. 1-16.
7. Козлов, Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль / Р.С. Козлов // Клини. антибиол. антимикроб. химиотер. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 16-30.
8. Крутиков М.Г., Бобровников А.Э. Антибиотикопрофилактика послеоперационных инфекционных осложнений у больных с термическими поражениями. // Антибиотики и Химиотерапия. – 2002. – Т. 47, № 1. – С. 21–25.

9. Кузнецова М. В., Карпунина Т.И., Авдеева Н. С. Мониторинг колонизации условно-патогенной микрофлорой новорожденных в период пребывания в лечебных учреждениях. // Журнал Медицинский альманах 2011. – Т. 5, № 19. – С. 156-158.
10. Мавзютов А. Р., Мирсаяпова И.А., Хасанова Г.Ф., Баймиев А.Х. Сравнительная оценка информативности методов этиологической диагностики внебольничной пневмонии // Журнал Клиническая лабораторная диагностика – 2012. – Т. 20. – С. 123-126.
11. Маянский, А.Н. *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса / А.Н. Маянский // Мол. генетика микробиол. вирусол. – 2012. – № 1 – С. 3-8.
12. Милько, Е.С. Морфологические и физиолого-биохимические особенности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* / Е.С. Милько, Л.П. Мартынкина // Микробиология. – 1996. – Т. 65, № 5. – С. 352-356.
13. Николаев, Ю.А. - «город микробов» или аналог многоклеточного микроорганизма / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 149-163.
14. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. // М: Наука – 2005. – Т. 1. – С. 526.
15. Подзолкова Н.М., Бархина Т.Г., Казачков А.Р. и др. Комплексное морфологическое изучение роли инфекционных процессов в этиологии и патогенезе неразвивающейся беременности: // Матер. 5-го Рос. форума «Мать и дитя». М. – 2003. – С. 171.
16. Решедько, Г.К. Неферментирующие грамотрицательные возбудители нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: проблемы антибиотикорезистентности / Г.К. Решедько, Е.Л. Рябкова, А.Н. Фаращук [и др.]. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2006. – № 8(3). – С. 1-16.
17. Розанова, С.М. Результаты мониторинга устойчивости возбудителей госпитальных инфекций к антибиотикам в ОРИТ Екатеринбурга / С. М.

- Розанова, В.А. Руднов, Я.Б. Бейкин [и др.] // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2005. – № 7 (4). – С. 410-8.
18. Романова, Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. // Журнал микробиологии. – 2011. – № 3 – С. 99-109.
19. Руднов, В.А. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa* / В.А. Руднов // Рус. меж. Журнал. – 2005. – Т. 13, № 7. – С. 485-490.
20. Руднов, В. А. Инфекции в отделениях реанимации и интенсивной терапии, вызванные *P. aeruginosa* и *Acinetobacter spp.* // Consilium Medicum. – 2008. – № 01. – Р. 37-44.
21. Руднов, В.А. Клиническая значимость инфекций, вызванных панрезистентными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* у пациентов ОРИТ / В.А. Руднов, З.А. Фролова, С.М. Розанова [и др.] // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2007. – № 9 (2). – С. 37.
22. Савинова Т. Л. и др. // Клини. микробиол. и антимикроб. химио-тер. – 2009. – Т. 11, № 1. – С. 79-80.
23. Самсыгина, Г.А. Антибактериальная терапия сепсиса у детей (пособие для врачей) / Г.А. Самсыгина – М., 2003. – С. 12.
24. Сидоренко, С.В. Клиническое значение *Pseudomonas aeruginosa* / С.В. Сидоренко // Клини. фармакол. и тер. – 2003. – Т. 12, № 2. – С. 1-7.
25. Сиянова Е.А., Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Прилипов А.Г. [и др.]. Мониторинг хронической инфекции легких у больных муковисцидозом, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa*. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии – 2018. – Т. 92, № 2.
26. Смирнов, В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* / В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова // Киев: Наук. Думка. — 1990. С. 65-69.

- 27.Телятицкий, Н.И. Нозокомиальная инфекция у новорожденных детей / Н.И. Телятицкий, Ю.К. Абаев // Мед. журнал. – 2010. – № 7. – С. 27-32.
- 28.Фадеева Г.Б., Стерхова Г.В., Сидоренко С.В. [и др.] Этиология и микробиологическая диагностика нозокомиальных пневмоний у новорожденных. Антибиотики и химиотерапия. – 2001. – Т. 46. № 5. – С. 17-22.
- 29.Хасанова Г.Ф., Мавзютов А.Р., Мирсаяпова И.А., Хасанова С.Г., Хазеева Г.Д., Магазов Р.Ш., Ворошилова Н.Н. Этиологическое значение и антибиотикочувствительность неферментирующих грамотрицательных бактерий в клинической практике // ЖУРНАЛ Медицинский вестник Башкортостана – 2012. – Т. 12, № 3. – С. 129-134.
- 30.Цветкова, Н.А. Изучение частоты адаптивных мутантов и гетерогенности популяции клеток штаммов *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и с фенотипом мелких колоний в результате действия ципрофлоксатина / Н.А. Цветкова, И.М. Гузачева, Н.В. Голясная, Л.А. Беляева // Фунд. исследования. – 2013. – № 11 (ч.4) – С. 706-710.
- 31.Чучалин А. Г. и др. // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 186-226.
- 32.Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Страчунский А.И. [и др.] Нозокомиальная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. // Пособие для врачей. – 2005.
- 33.Шагинян, И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности / И.А. Шагинян, М.Ю. Чернуха // Клин. антибиол. антимикроб. химиотер. – 2005. – Т. 7, № 3. – С. 271-285.
- 34.Abdel-Mawgoud, A.M. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles / A.M. Abdel-Mawgoud, F. Lepine, E. Deziel // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 86 (5). – P. 1323-1336.

35. Adams, P. Сидерофоровая активность пиовердина для *Pseudomonas aeruginosa* // *Cox Infect. Иmun.* – 1985. – Т. 48 №. 1 – С. 130-138.
36. Aragone MR, Maurizi DM, Clara LO, Navarro Estrada JL, Ascione A. *Pseudomonas mendocina*, an environmental bacterium isolated from a patient with human infective endocarditis. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:1583–4
37. Armstrong, S. Insight into the catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A. Studies of toxin interaction with eukaryotic elongation factor-2 / S. Armstrong, S.P. Yates, A.R. Merrill // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277 (48). – P. 46669-46675.
38. Azusa I., Yoshimitsu M., Hiroshi T., Naoko Tsuji Shingo Fujisaki и Jun-ichi Kato. Involvement of an Essential Gene, *mviN*, in Murein Synthesis in *Escherichia coli*. // *J. Bacteriol.* – 2008, doi: 10.1128/JB.00551-08.
39. Balachandran Priya B, Leonard Dragone, Lynne Garrity-Ryan, Armando Lemus, Arthur Weiss and Joanne Engel. The ubiquitin ligase Cbl-b limits *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin T-mediated virulence. // *J Clin Invest.* – 2007; – V. 117 (2). – P. 419-427.
40. Beare, P.A. Siderophore mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis / P.A. Beare, R.J. For, L.W. Martin, I.L. Lamont // *Mol. Microbiol.* – 2003. – V. 47. – P. 195-207.
41. Benjamin, WH, Jr., J. Yother, P. Hall и DE Briles. The *Salmonella typhimurium* locus *mviA* regulates virulence in Itys but not Ityr mice: functional *mviA* results in avirulence. // *J. Exp. Med.* – 1991. – V. 174. – P. 1073-1083.
42. Bertrand, X. Antimicrobial susceptibility among gram-negative isolates collected from intensive care units in North America, Europe, the Asia-Pacific Rim, Latin America, the Middle East, and Africa between 2004 and 2009 as part of the Tigecycline evaluation and surveillance trial / X. Bertrand, M.J. Dowzicky // *Clin. Ther.* – 2012. – V. 34. – P. 124-137.



43. Caiazza, N. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 / N. Caiazza, J. Merritt, J. Brothers, G. O'Toole // *J. Bacteriol.* – 2007. – V. 189(9). – P. 3603-1362
44. Chi CY, Lai CH, Fung CP, Wang JH. *Pseudomonas mendocina* spondylodiscitis: A case report and literature review. // *Scand J Infect Dis.* – 2005. – V. 37. – P. 951–953.
45. Chiu LQ, Wang W. A case of unusual Gram-negative bacilli septic arthritis in an immunocompetent patient. // *Singapore Med J.* – 2013. – V. 54(8). – P. 164–168.
46. Ciara, M. Shaver, Alan R. Hauser. Relative Contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to Virulence in the Lung. // *Инфекция иммунитета.* – 2004. – V. 72 (12): 6969-6977. doi: 10.1128 / IAI.72.12.6969-6977.2004
47. Cornelis, G.R. The type III secretion injectisome, a complex nanomachine for intracellular “toxin” delivery / G.R. Cornelis // *Biol. Chem.* – 2010. – V. 391. – P. 745-751.
48. D'Agata E. *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas species*. In: Bennett J, Dolin R, Blaser M, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases.* // 8th ed. Philadelphia: Saunders. 2015. – P. 2518–31.
49. Dara, W. Frank. Research Topic on *Pseudomonas aeruginosa*. // *Biology, Genetics, and Host–Pathogen Interactions.* – 2012. doi: 10.3389 / fmicb.2012.00020, PMID: PMC3270588
50. Davey, M. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / M. Davey, N. Caiazza, G. O'Toole // *J. Bacteriology.* – 2003. – V. 185(3). – P. 1027-1036.
51. Deprele C., Berthelot P., Lemetayer F., et al. Risk factors for systemic emboli in infective endocarditis. // *Clin Microbiol Infect.* – 2004. – V. 10(1). –P. 4653.

52. Diaz MR, King JM, Yahr TL. Intrinsic and extrinsic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. // Front. Microbiol. – 2011. – 2 :89.10.3389/fmicb.2011.00089
53. Goodman AL, Kulasekara B., Rietsch A., Boyd D., Smith RS., Lory S. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. // Dev Cell. – 2004. – V. 7 (5). – P. 745-54.
54. Donlan, R.M. Biofilms and device-associated infections / R.M. Donlan // Emerg. Infect. Dis. – 2001. – V. 7. – P. 277-281.
55. Gras-Le Guen C, Lepelletier D, Debillon T, Gournay V, Espaze E, Roze JC. Contamination of a milk bank pasteuriser causing a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a neonatal intensive care unit. // National Library of Medicine National Institutes of Health. – 2003. – V. 88(5). – P. 434-435.
56. Drusano GL. Prevention of resistance: a goal for dose selection of antimicrobials agents // Clin Infect Dis – 2003. – V. 36 – P. 42-52
57. Filloux, A. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity, evolution and function / A. Filloux // Front Microbiol. – 2011. – V. 2. – P. 155.
58. Foglia, E. A. Ventilator-associated pneumonia in neonatal and pediatric intensive Care Unit patients / E. Foglia, M.D. Meier, A. Elward // Clin. Microbiol. Rev. – 2007. – V. 20(3). – P. 409-425.
59. Frank, D.W. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa* / D.W. Frank // Mol. Microbiol. – 1997. – V. 26. – P. 621-629.
60. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins / P. Lanotte [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2013. – V. 62, N 7. – P. 1015-1024.
61. Ghafoor, A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture / A. Ghafoor, I.D Hay., B.H.A. Rehm // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V. 77(15). – P. 5238-5246.

62. Gibson, J. *Pseudomonas aeruginosa* - *Candida albicans* interactions: localization and fungal toxicity of a phenazine derivative / J. Gibson, A. Sood, D.A. Hogan // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75(2). – P. 504-513.
63. Goel, V. Ventilator associated pneumonia in a medical intensive care unit: Microbial aetiology, susceptibility patterns of isolated microorganisms and outcome / V. Goel, S.A. Hogade, S.G. Karadesai // *Ind. J. Anaesthesia.* – 2012. – V. 56(6). – P. 558-562.
64. Govan, J.R.W. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection / J.R.W. Govan, A.R. Brown, A.M. Jones // *Future Microbiol.* – 2007. – V. 2. – P. 153-164.
65. Guan, Z., SD Breazeale и CRH Raetz., Extraction and identification by mass spectrometry of undecaprenyl diphosphate-MurNAc-pentapeptide-GlcNAc from *Escherichia coli*. // *Anal Biochem.* – 2005. – V. 15; № 345(2). – P. 336-339.
66. Harris M. et al. // *Thorax.* – 2011. – Vol. 66 (suppl. 2). – P. 584.
67. Hauser AR, Cobb E, Bodi M, Mariscal D, Vallés J, Engel JN, Rello J. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. // *Crit Care Med.* – 2002. – V. 30 (3). – P. 521-528.
68. Helenius, J., DT Ng, CL Marolda, P. Walter, MA Valvano и M. Aebi. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. // *Nature.* – 2002. – P. 447-450.
69. Hovey, A.K. Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon / A.K. Hovey, D.W. Frank // *J. Bacteriol.* – 1995. – V. 177. – P. 4427-4436.

70. Howe TS, Erlich G, Koh JSB, Ng ACM, Costerton W. A case of an atypical femoral fracture associated with bacterial biofilm-pathogen or bystander? // *Osteoporos Int.* – 2013. – V. 24. – P. 1765–1766.
71. Xiaoyou L., Xuan-Quynh T. Pham, Maynard VO, Stephen L. Identification of a Genomic Island Present in the Majority of Pathogenic Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. // *Bacteriol.* – 2001. – V. 183 №.3 – 843-853.
72. Kadusevicius E, Zmuidaite V, Stankeviciene I et al. Clinical outcomes and effectiveness of antimicrobial treatment of patients with antibiotic-resistant *P. aeruginosa* pneumonia. // *Clin Microbiol Inf* – 2003 – V. 9 (8). – P. 1513.
73. Kao, C.M., J.K. Liu, Y.L. Chen, C.T. Chai and S.C. Chen. Factors affecting the biodegradation of PCP by *Pseudomonas mendocina* NSYSU. // *J. Hazardous Mater.*, – 2005 – V. 124 – P. 68-73.
74. Kao, C.M., H.Y. Chien and R.Y. Surampalli. Assessing of natural attenuation and intrinsic bioremediation rates at a petroleum-hydrocarbon spill site: Laboratory and field studies. / *J. Environ. // Eng. ASCE.* – 2010. – V. 136. – P. 54-67.
75. Kaponis A, Lazaros L, Xita N, Hatzi E, Takenaka A, Makrydimas G, et al. CYP19 gene variants affect the assisted reproduction outcome of women with polycystic ovary syndrome. // *Gynecol Endocrinol.* – 2013. – V. 29(5). – P. 478-82. doi: 10.3109/09513590.2013.774359.
76. Kato, J., S. Fujisaki, K. Nakajima, Y. Nishimura, M. Sato, and A. Nakano. The *Escherichia coli* homologue of yeast RER2, a key enzyme of dolichol synthesis, is essential for carrier lipid formation in bacterial cell wall synthesis. // *J. Bacteriol.* – 1999. – V. 181. – P. 2733 -2738.
77. Kaufman, M.R. *Pseudomonas aeruginosa* mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of ExoS / M.R. Kaufman, J. Jia, L. Zeng // *Microbiology.* – 2000. – V. 146(10). – P. 2531-2541.
78. Khan, A.A. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR /

- A.A. Khan, C.E. Cerniglia // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – V. 60. – P. 3739-3745.
79. Kinney J.S., Ramseier C.A., Giannobile W.V. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. // Ann N Y Acad Sci. – 2007. – V. 1098 – P. 230—251.
80. Klaenhammer, T. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria / T. Klaenhammer // FEMS Microbiol. Rev. – 1993. – V. 12. – P. 39-86.
81. Gambello, MJ, S. Kaye and BH Iglewski. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. / MJ Gambello // American Society for Microbiology Infection and Immunity – 1993. – V. 61 № 4. – P. 1180-1184.,
82. Lee, VT, RS Smith, B. Tummeler и S. Lory. 2005. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. // Infect. ИМУН. – 2005. – V. 73 (3) – P. 1695-1705. doi: 10.1128 / IAI.73.3.1695-1705.2005 73 1695-1705.
83. Lin, H.H. Presence of the *exoU* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is correlated with cytotoxicity in MDCK cells but not with colonization in BALB/c mice. / H.H. Lin, S.P. Huang, H.C. Teng. // J., lin. Microbiol. – 2006. – V. 44 (12). – P. 4596-4597.
84. Johansen HK, Kjeldsen K, Heiby N. *Pseudomonas mendocina* as a cause of chronic infective endocarditis in a patient with situs inversus. // Clin Microbiol Infect. – 2001. – V. 7– P. 650–652.
85. Joo, E.J. Clinical predictors of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia among Gram-negative bacterial infections in non-neutropenic patients with solid tumor / E.J. Joo, C.I. Kang, Y.E. Ha. // J. Infect. – 2011. – V. 63(3). – P. 207-214.
86. Leppla, S.H. The exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*: a proenzyme having a usual mode of activation / S.H. Leppla, I.C. Martin, L.A. Muel // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1978. – V. 81. – P. 532-538.

87. Lequette, Y. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / Y. Lequette, E.P. Greenberg // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187(1). – P. 37-44.
88. Maier, R. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications / R. Maier, G. Soberon-Chavez // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – V. 54. – P. 625-633.
89. Mert A, Yilmaz M, Ozaras R, Kocak F, Dagsali S. Native valve endocarditis due to *Pseudomonas mendocina* in a patient with mental retardation and a review of the literature. // *Scand J Infect Dis.* – 2007. – V. 39. – P. 615–616.
90. Michel-Briand, Y. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Michel-Briand, C. Baysee // *Biochimie.* – 2002. – V. 84(6). – P. 499-510.
91. Morrison, A.J. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* / A.J. Morrison, R.P. Wenzel // *Rev. Infect. Dis.* – 1984. – V. 6(3). – P. 627-642.
92. Murray, T. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella / T. Murray, B. Kazmierczak // *J. Bacteriol.* – 2008. – V. 190(8). – P. 2700-2708.
93. Nikbin VS, Aslani MM, Sharafi Z, Hashemipour M, Shahcheraghi F, Ebrahimipour GH. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. // *Iranian Journal of Microbiology* – 2012. – V. 4(3). – P. 118-123.
94. Nseir W, Hussein T, Abid A, Khateeb J. *Pseudomonas mendocina* sepsis in a healthy man. // *Isr Med Assoc J.* – 2011. – V. 13. – P. 375–376.
95. Omote, H., M. Hiasa, T. Matsumoto, M. Otsuka, and Y. Moriyama. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2006. – V. 27. – P. 587 -593.
96. Palleroni NJ, Doudoroff M, Stanier RY. Taxonomy of the aerobic *Pseudomonas*: the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. // *J Gen Microbiol.* – 1970. – V. 60. – P. 215–231.

97. Peek, M.E. Pyoverdine, the major siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, evades NGAL recognition / M.E Peek, Bhatnagar, N.A. McCarty, S.M. Zughair // Int. Perspectives Inf. Dis. – 2012. – ID 843509. – P. 10.
98. Schooling, S.R. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms / S.R. Schooling, T.J. Beveridge // J. Bacteriol. – 2006. – V. 188(16). – P. 5945-5957.
99. Rejman, J., S. Di Gioia, A. Bragonzi и M. Conese. *Pseudomonas aeruginosa* infection destroys the barrier function of lung epithelium and enhances polyplex-mediated transfection. // Hum. Gene Ther. – 2007. – V. 18 P. 642-652.
100. Rholl, DA, Trunck LA, Schweizer HP. Appl. In vivo Himar1 transposon mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei*. // Environ Microbiol. – 2008. – V. 74(24). – P. 7529-35. doi: 10.1128/AEM.01973-08. PMID: 18952878
101. Rick, PD, K. Barr, K. Sankaran, J. Kajimura, JS Rush, and CJ Waechter. 2003 Evidence that the *wzxE* gene of *Escherichia coli* K-12 encodes a protein involved in the transbilayer movement of a trisaccharide-lipid intermediate in the assembly of enterobacterial common antigen. // J. Biol. Химреагент – 2003. – V. 278. – P. 16534-16542.
102. Roosjen, A. Bacterial factors influencing adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to a poly(ethyleneoxide) brush / A. Roosjen, H.J. Busscher, W. Norde, H.C. Van der Mei // Microbiology. – 2006. – V. 152(9). – P. 2673-2682.
103. Rucks, EA, JE Fraylick, LM Brandt, TS Vincent, and JC Olson. Cell line differences in bacterially translocated ExoS ADP-ribosyltransferase substrate specificity. // Microbiology. – 2003. – V. 149 (2). – P. 319-331.
104. Sanyal, G. A transforming growth factor- $\alpha$ -*Pseudomonas* exotoxin hybrid protein undergoes pH-dependent conformational changes conducive to membrane interaction / G. Sanyal, D. Marquis-Omer, J.O. Gress, C.R. Middaugh // Biochemistry. – 1993. – V. 32(13). – P. 3488-3497.

105. Sato H., Frank DW. Multi-functional characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* type III needle-tip protein, PcrV; comparison to orthologs in other Gram-negative bacteria. // Front. Microbiol. – 2011. – 2 :142.10.3389/fmicb.
106. Siegall, C.B. Functional analysis of domains II, Ib, and III of *Pseudomonas* exotoxin / C.B. Siegall, V.K. Chaudhary, D.J. FitzGerald, I. Pastan // J. Biol. Chem. – 1989. – V. 264. – P. 14256-14261.
107. Smith, R.S. *P. aeruginosa* quorum sensing systems and virulence / R.S. Smith, B.H. Iglewski // Cur. Opin. Microbiol. – 2003. – V. 6(1). – P. 56-60.
108. Socransky S.S., Haffajee A.D., Smith C. Et al. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. // J Clin Periodontol – 2000. – V. 27 (11). – P. 810—818.
109. Suel P, Martin P, Berthelot G, Robaday S, Etienne M, Chibani A. A case of *Pseudomonas mendocina* endocarditis. // Med Mal Infect. – 2011. – V. 41. – P. 109–110.
110. Sun J, Barbieri JT. ExoS Rho GTPase-activating protein activity stimulates reorganization of the actin cytoskeleton through Rho GTPase guanine nucleotide disassociation inhibitor. // J Biol Chem. – 2004. – V. 279 (41). – P. 42936-44.
111. Shibutani T., Nishino W. ELISA detection of glycosaminoglycan (GAG)-linked proteoglycans in gingival crevicular fluid. // J Periodontal Res. – 1993. – V. 28(1). – P. 17-20.
112. Socransky S.S., Haffajee A.D., Smith C. Et al. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. // J Clin Periodontol – 2000. – V. 27 (11). – P. 810-818.
113. Tanner, A. C. R., P. M. Milgrom, R. Kent, Jr., S. A. Mokeem, R. C. Page, C. A. Riedt, P. Weinstein, and J. Bruss. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. // J. Dent. Res. – 2002. – V. 80. – P. 2060–2065.



114. Tedjosasongko, U., and K. Kozai. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery. // *ASDC J. Dent. Child.* – 2002. – V. 69. – P. 284–288, 234–235.
115. Tyler K. Ulland, Blake W. Buchan, Margaret R. Ketterer, Teresa Fernandes-Alnemri. Cutting Edge: Mutation of *Francisella tularensis* mviN Leads to Increased Macrophage Absent in Melanoma 2 Inflammasome Activation and a Loss of Virulence. // *J Immunol.* – 2010. –V. 185 (5). – P. 2670-2674. doi: 10.4049 / jimmunol.1001610
116. Vallis, A.J. Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells / A.J. Vallis, V. Finck-Barbancon, T.L. Yahr, D.W. Frank // *Infect. Immun.* – 1999. – V. 67(4). – P. 2040-2944.
117. Van Dam, V., R. Sijbrandi, M. Kol, E. Swiezewska, B. de Kruijff, and E. Breukink. Transmembrane transport of peptidoglycan precursors across model and bacterial membranes. // *Mol. Microbiol.* – 2007. – V. 64. – P. 1105 -1114.
118. Van Delden, C. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections / C. Van Delden, B.H. Iglewski // *Emerg. Infect. Dis.* – 1998. – V. 4. – P. 551-560.
119. Vance, RE, A. Rietsch, JJ Mekalanos. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. // *Infect. ИмуH.* – 2005. – V. 73 (3). – P. 1706-1713. doi: 10.1128 / IAI.73.3.1706-1713.2005
120. Warady B, Bakkaloglu S, Newland J, Cantwell M, Verrina E, et al. Consensus guidelines for the prevention and treatment of catheter-related infections and peritonitis in pediatric patients receiving peritoneal dialysis. // *Perit Dial Int.* – 2012. – V. 32. –P. 32–86.
121. Williams J.S. Characterization of bioactive secondary metabolites from *Pseudomonas aeruginosa* and *Porocentrum species* / J.S. Williams // Submitted to the University of North Carolina Wilmington in partial

- fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science. – 2003. – P. 91.
122. Wolska, K. BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates / K. Wolska, B. Kot, A. Jakubczak, K. Rymuza // Folia Histochem. Cytobiol. – 2011. – V. 49(4). – P. 734.
123. Wolska, K. Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains / K. Wolska, P. Szweda // Pol. J. Microbiol. – 2009. – V. 58(3). – P. 255-260.
124. Yahr, T.L. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene / T.L. Yahr, A.K. Hovey, S.M. Kulich, D.W. Frank // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177(5). – P. 1169-1178
125. Yang, B.M., C.M. Kao, C.W. Chen, W.P. Sung and R.Y. Surampalli. Application of *in situ* chemical oxidation for the remediation of TPH-contaminated soils. // Applied Mech. Mater. – 2012. – P. 121-126. P. 196-200.

## Состав питательных сред

**Кровяной агар**

Компонент среды	Количество
Пептон протеозный	15,0 г
Хлорид натрия	5,0 г
Экстракт дрожжевой	5,0 г
Вытяжка печеночная	2,5 г
Агар	15,0 г
Вода дистиллированная	1000,0 мл
В остуженную до 50*С среду добавляют стерильную кровь крупного рогатого скота или человека (без консервантов)	7% (по объему)

**Среда Эндо**

Компонент среды	Количество
Агар мясопептонный	1000,0 мл
Лактоза	10,0 г
Фуксин основной, спиртовой насыщенный раствор	10,0 мл
Натрия сульфит, водный 10% раствор	100,0 мл
Стерильная желточная взвесь	20% (по объему)

**Агар Мюллера- Хинтона**

Компонент среды	Количество
Вытяжка из говядины	300,0 г
Гидролизат казеина кислотный	17,5 г
Крахмал	1,5 г
Агар	15,0 г
Вода дистиллированная	1000,0 мл

### Среда Хью-Лейфсона

Принцип. Среда позволяет уловить изменения рН даже при слабом окислении углеводов, что достигается заменой аминокислот питательной среды пептоном. В этой среде отсутствуют щелочные продукты расщепления аминокислот, которые могут нейтрализовать кислые продукты при утилизации углеводов.

Компонент среды	Количество
Пептон	2,0 г
Натрий хлористый	5,0 г
Калий фосфорнокислый двузамещенный (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,3 г
Глюкоза	10,0 г
Агар	3,0 г
Бромтимоловый синий	0,03 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл

Приготовление среды. К воде прибавляют пептон, натрий хлористый и агар. Смесь подогревают до расплавления агара. Затем добавляют калий фосфорнокислый двузамещенный и глюкозу. Продолжают кипятить 2-3 минуты. Смесь подщелачивают 20% раствором едкого натра до рН 7,4-7,5, доводят объем среды до первоначального и добавляют 3 мл 1% водного раствора бромтимолового синего. Среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 10-15 мл в стерильные пробирки. Стерилизуют при 0,5 атм. 20 минут.

Цвет среды до стерилизации - синий, после автоклавирования - травянисто-зеленый, рН 7,1-7,2. При кислом рН среда желтеет.

### Агар Клиглера

Коммерческая сухая среда готовится в соответствии с указаниями на этикетке препарата. Готовая к употреблению среда имеет красновато-бурый или оранжево-красный цвет, при скашивании следует оставлять столбик высотой 2 - 2,5 см.

**Полужидкий агар для определения подвижности**

Компонент среды	Количество
Натрий хлорид (NaCl)	5 г
Гидролизат Хоттингера	120 - 150 мл
Агар	3-4 г
Вода дистиллированная	1000 мл

Приготовление среды. Гидролизат Хоттингера разводят водой до содержания в среде 1,2 - 1,4% аминного азота, добавляют хлорид натрия, устанавливают рН 7,2 - 7,4, добавляют агар и полностью расплавляют его, подогревая среду при постоянном помешивании. Затем фильтруют в горячем состоянии через тканевый фильтр, проверяют прозрачность (визуально) и в случае необходимости осветляют с помощью яичного белка или путем отстаивания в узких сосудах. Среду разливают по 5 мл в пробирки при 121 °С 30 минут. Охлаждают в вертикальном положении.

Примечание. Среда может быть одновременно использована для определения образования индола.



# Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

ISSN 2309-7183



приложение №3, 2018

[vestnikbgmu.ru](http://vestnikbgmu.ru)

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНА <i>GSTP</i> ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС.....	1102
М.В. Курилов, Д.О. Каримов, Н.Ю. Хуснутдинова, Р.А. Даукаев	
МЕТАБОЛИЗМ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ КОНСЕРВАНТОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА.....	1107
КутлинаТ.Г. <sup>1</sup> , ВаловаЯ.В. <sup>1,2</sup> , КаримовД.О. <sup>1</sup> , МухаммадиеваГ.Ф. <sup>1</sup> , ХуснутдиноваН.Ю. <sup>1</sup>	
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА <i>GSTT</i> ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС.....	1112
А. Р. Муллабаева	
СТРЕПТОКОККИ КАК ПАТОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОР РАЗВИТИЯ ОЧАГОВОЙ ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИЕЙ ТВЕРДЫХ ТКАНЕЙ ЗУБОВ.....	1117
Э.Н. Усманова, А.С. Фазлыева, Д.О. Каримов, Р.А. Даукаев, Д.А. Смолянкин	
НАКОПЛЕНИЕ КАДМИЯ В ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ.....	1122
А.С. Фазлыева, Э.Н. Усманова, Д.О. Каримов, Р.А. Даукаев, Д.А. Смолянкин	
НАКОПЛЕНИЕ КАДМИЯ В ОРГАНАХ КРЫС ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОМ ОТРАВЛЕНИИ.....	1127
И.А. Янгурина, К.А. Сазонова, Е.Ш. Зулькарнаева	
СРАВНЕНИЕ ИНФОРМАТИВНОСТИ МЕТОДОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	1132
Э.Ф. Бердигулова	
К ВОПРОСУ О РОЛИ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ И СРЕДЫ В ПРОЯВЛЕНИИ НАРКОЛЕПСИИ.....	1137
К.Ю. Швец <sup>1</sup> , А.Р. Бахтиева <sup>1</sup> , А.Т. Загафуранова <sup>1</sup> , А.Д. Дворенкова <sup>1</sup> , Е.В. Третьякова <sup>2</sup>	
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ.....	1142
Е. Ш. Зулькарнаева, К. А. Фархутдинова, И. А. Янгурина	
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ, СПИРТОВЫХ И ГЕКСАНОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ВОДЯНОГО ОРЕХА <i>TRAPASIBIRICA</i> И ДРУГИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ.....	1147
Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагужина, Э.Д. Гайнуллина, Л.О. Бижбалова, Л.Р. Хакимова	
ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ «ОСТРОВОВ» ГЕНОТОКСИЧНОСТИ <i>PKS+ESCHERICHIACOLI</i> ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА.....	1152
А.А. Трушкова, П.Е. Базарова	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ В ОБРАЗЦАХ ВОДЫ ОТКРЫТЫХ ВОДОЁМОВ ГОРОДА УФЫ.....	1157
Л.О. Бижбалова, Л.Р. Хакимова, Э.Д. Гайнуллина, Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагужина	
БАКТЕРИИ РОДА <i>SAMPYLOBACTER</i> И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЯЗВЕННЫЙ КОЛИТ.....	1160
Д. Ю. Анпилогова	

УДК 579.61:577.2:543.51

И.А. Янтурина, К.А. Сазонова, Е.Ш. Зулкарнаева

**СРАВНЕНИЕ ИНФОРМАТИВНОСТИ МЕТОДОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО  
ИССЛЕДОВАНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ  
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Научный руководитель – д.м.н., профессор А.Р. Мавзютов

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, Башкирский  
государственный медицинский университет, г. Уфа

*Резюме.* Сравнение информативности методов микробиологического исследования, используемых в клинической практике для идентификации микроорганизмов: бактериологического, молекулярно-генетического методов и технологии MALDI-TOF масс-спектрометрии. Приведена оценка объективности использования методов лабораторной диагностики для выявления и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний.

*Ключевые слова:* идентификация, бактериологический метод, ПЦР, MALDI-TOF масс-спектрометрия.

I.A. Yanturina, K.A. Sazonova, E.Sh. Zulkarnaeva

**COMPARISON OF INFORMATIONAL CONTENT OF THE METHODS OF THE  
MICROBIOLOGICAL RESEARCH USED FOR IDENTIFICATION OF  
MICROORGANISMS**

Scientific Advisor – Ph. D. in Medicine, Full professor A.R. Mavzyutov

Department of Fundamental and Applied Microbiology, Bashkir State Medical University,  
Ufa

*Abstract.* Comparison of informational content of the methods of a microbiological research using in clinical practice for identification of microorganisms: bacteriological, molecular-genetic methods and MALDI-TOF technology of a mass spectrometry. Giving an assessments of objectivity of use of methods of laboratory diagnostics for identification and identification of originators of infectious diseases.

*Keywords:* identification, bacteriological method, PCR, MALDI-TOF mass-spectrometry.

*Актуальность.* Эффективность лечения тяжелых инфекций и предотвращение различных осложнений заболевания напрямую зависят не только от достоверности результатов микробиологической диагностики, а также от скорости их предоставления лечащему врачу. Искажение результатов идентификации этиологически значимых инфекционных агентов может привести к возникновению эпидемии, что значительно увеличит показатели летальных исходов. В настоящее время специалисты клинико-лабораторной диагностики используют различные методы выделения и идентификации возбудителей, позволяющие получать высокоинформативные результаты в совокупности с



сокращением времени исследования и упрощением постановки анализа. Видовую принадлежность патогенных микроорганизмов позволяют определить такие методы, как биохимическая идентификация, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и технология времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF масс-спектрометрия). К сожалению, не все специалисты достаточно осведомлены о достоинствах и недостатках используемых на практике технологий идентификации, в связи с чем возникает сложность выбора наиболее эффективного метода для работы с той или иной группой микроорганизмов, в результате чего снижается результативность исследования.

*Цель исследования.* Сравнение информативности и эффективности использования биохимического метода, ПЦР и MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации возбудителей инфекционных заболеваний.

*Результаты и обсуждение.* Бактериологический метод заключается в посеве исследуемого материала на питательные среды, выделении чистой культуры возбудителя и его идентификации. Определение вида и типа возбудителя производят по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим (ферментации углеводов и белков) признаков. Биохимическая идентификация чистой культуры проводится с помощью дифференциально-диагностических сред - длительный и трудоемкий процесс, занимающий 18-24 часа и более, критичное для пациента время. При идентификации симбиотических и патогенных бактерий дополнительно требуется 1.5-2 суток для установления специфичности симбионта к хозяину, а также устойчивости к антимикробным веществам и фагам. Недостатком метода считается вероятность получения недостоверного результата при отсутствии/ограничении возможности культивирования некоторых групп микроорганизмов на стандартные диагностические среды и при определении видовой принадлежности бактерий с нетипичными биохимическими свойствами. Для унификации и стандартизации процесса идентификации разработаны стандартизованные тест-системы: Enterotube, Mucotube, Patho-Тес, СИБ. Использование автоматических и полуавтоматических микробиологических анализаторов повышает качество результата и сокращает время исследования, но не позволяет устранить недостатки биохимической идентификации.

В настоящее время в России и за рубежом активно развиваются новые подходы к диагностике инфекционных заболеваний. Использование масс-спектрометрического анализа, позволяющего анализировать сложные биоорганические молекулы, обеспечило настоящий прорыв в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний. Внедрённый в клиническую микробиологию метод матричной лазерной десорбционной ионизации в комплексе с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) позволяет точно,

быстро и без существенных затрат проводить видовую идентификацию большинства клинически значимых бактерий и дрожжевых грибов. Идентификация патогена основана на результатах сопоставления полученных масс-спектров рибосомальных белков и спектров базы данных анализатора. Обширная база данных MALDI-TOF MS содержит как клинически значимые, так и ветеринарные, промышленные и редко встречающиеся в лабораторной практике штаммы. К примеру, база масс-спектрометра MicroFlex включает более 2500 видов клинически значимых бактерий, дрожжей, плесневых грибов/дерматофитов, микобактерий. Методика проведения масс-спектрометрического анализа состоит из двух этапов: пробоподготовка и идентификация культуры. Пробоподготовка образца заключается в смешивании отдельной колонии (предварительно выделенной чистой культуры) исследуемого микроорганизма с раствором матрицы на слайд-подложке, которую подвергают воздействию лазерных импульсов в масс-анализаторе. Процесс определения видовой принадлежности автоматический, не требует вмешательства исследователя. Идентификация одной культуры занимает менее 2 минут, одновременный анализ 96 культур – в среднем 1-1,5 часа. Проводятся клинические исследования, направленные на оптимизацию и унификацию этапа предварительной пробоподготовки образцов. Разрабатываются методики обработки первичного клинического материала для прямой идентификации MALDI-TOF MS [2].

В межклинической бактериологической лаборатории ММА им. И.М. Сеченова лабораторная апробация метода MALDI-TOF MS показала эффективность – 99,7%. Расхождение с бактериологическими данными составило 4,5%. Метод позволяет обеспечить высокую производительность и скорость анализа, специфичность и чувствительность которого близка к 99,9% [3].

Использование автоматического анализатора MALDI-TOF MS для идентификации микроорганизмов и определения их антибиотикорезистентности позволяет проводить мониторинг и контроль качества нозокомиальных инфекций в лечебных учреждениях. Стоит отметить, что методом масс-спектрометрии идентифицируют возбудителей инфекционных заболеваний, вызывающих серьезные осложнения при длительном отсутствии адекватного лечения. Специалисты получают достоверные результаты идентификации представителей неферментирующих грамотрицательных бактерий рода *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. fulva*, *P. mendocina*) [4], нетуберкулезных микобактерий (*Mycobacterium fortuitum*, *M. kansasii*, *M. avium*) [1], штаммы холерных вибрионов (*Vibrio cholerae*) [5]. Экспресс-диагностика заболеваний, возбудители которых рассматриваются в качестве потенциальных агентов биологического оружия, позволит предотвратить высокую летальность и групповые вспышки заболевания. К числу таких

заболеваний относят сап (*Burkholderiamallei*), мелиоидоз (*Burkholderiapseudomallei*), брюшной тиф (*Salmonella typhi*) и паратифы (штаммы *Salmonella paratyphi*), дизентерия (*Shigella dysenteriae*).

Метод полимеразной цепной реакции используется в диагностических лабораториях для идентификации микроорганизмов. Принцип реакции амплификации заключается многократном избирательном копировании определенного гена (участка ДНК) *in vitro*. Технология ПЦР обладает высокой скоростью проведения анализа и предоставления результатов, чувствительностью и специфичностью до 92% [3]. Мишенью для амплификации служат видоспецифичные для возбудителя участки ДНК - консервативные участки генома, к числу которых относят фрагменты генов 16S рРНК и фрагменты генов токсинов. Эффективность анализа зависит от верного подбора олигонуклеотидных праймеров и выбора оптимального режима амплификации. Метод молекулярной биологии позволяет выявлять патогенные вирусы, бактерии и простейшие не только в чистой культуре, но и в различных биологических жидкостях, предварительно обработанных реагентами коммерческих наборов для качественного выделения ДНК. Важными преимуществами ПЦР также считаются возможность выявления компонентов вирусной частицы и работа с трудно культивируемыми микроорганизмами, относящихся к роду *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Leptospira*, *Chlamydia*, *Legionella*, *Helicobacter*. К настоящему времени подобраны ДНК-зонды и разработаны многочисленные модификации ПЦР для выявления почти всех практически этиологически значимых вирусов, бактерий, грибов, простейших.

Самой современной и эффективной технологией среди молекулярно-генетических исследований является метод Real-time PCR (ПЦР в реальном времени). К преимуществам Real-time PCR относят мониторинг и количественный анализ накопления продуктов полимеразной цепной реакции, автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. Определение количественных характеристик инфекции позволяет судить о динамике и стадии заболевания, а также об эффективности проводимой терапии.

Таблица 1. Оценка информативности методов идентификации.

Параметры идентификации	Биохимическая идентификация	ПЦР	MALDI-TOF MS
Необходимость предварительного выделения чистой культуры	+	-	+
Достоверный результат при генетических изменениях	+	-	+
Достоверный результат при морфологических изменениях	-	+	-
Достоверный результат при биохимических изменениях	-	+	-

Определение антибиотикорезистентности	+	–	+
---------------------------------------	---	---	---

Продолжение таблицы 1.

Параметры идентификации	Биохимическая идентификация	ПЦР	MALDI-TOF MS
Одновременный анализ нескольких образцов за одну аналитическую серию	–	+	+
Определение спектра и структурных изменений рибосомальных/мембранных белков	–	–	+
Оценка жизнеспособности микроорганизма	+	–	+
Проведение генетических исследований	–	+	+
Работа с трудно культивируемыми организмами	–	+	–
Скорость проведения анализа	До 5 суток	До 5-7 часов	До 2 часов

**Выводы.** MALDI-TOF MS позволяет существенно повысить точность идентификации выделенных микроорганизмов, и тем самым представляет большую ценность среди микробиологических исследований для диагностики инфекционных заболеваний. Метод ПЦР широко используется в исследованиях санитарной микробиологии, где применяется для диагностики биологических объектов, оценки качества пищевых продуктов. Сочетание технологии MALDI-TOF MS и различных модификаций молекулярно-генетических методов в лабораторной практике поднимет на новый уровень микробиологическую диагностику инфекционных заболеваний, а также позволит составить индивидуальный генетический паспорт человека, что, несомненно, будет иметь большое практическое и научное значение.

#### Список литературы.

1. Лямин А.В. и др. // Сравнительный анализ методов идентификации нетуберкулезных микобактерий, выделенных из клинического материала. – М.: Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7, № 3. – С.: 285-291
2. Попов Д.А., Овсеенко С.Т. // Экспресс-идентификация положительных гемокультур с помощью метода прямой MALDI-TOF масс-спектрометрии. - М.: Анестезиология и реаниматология. – 2015; 60(5): 71-75.
3. Припутневич Т.В. и др. // Использование методов MALDI-TOF MS и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний – М.: Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 4-9.
4. Сиволодский Е.П. и др. // Чувствительность к антибиотикам и идентификация клинических штаммов *Pseudomonas fulva*. – М.: Антибиотики и химиотерапия, 2014.

УДК 579.61:615.19

Е. Ш. Зулкарнаева, К. А. Фархутдинова, И. А. Янтурина

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ, СПИРТОВЫХ И ГЕКСАНОВЫХ  
ЭКСТРАКТОВ ВОДЯНОГО ОРЕХА *TRAPASIBIRICA* И ДРУГИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ**

Научный руководитель – д. б. н., профессор Б. Р. Кулуев

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, Башкирский государственный  
медицинский университет, г. Уфа

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа

**Резюме.** Получены водные, спиртовые и гексановые экстракты плодов водяного ореха *Trapasibirica*, луковиц чеснока и лука, плодов можжевельника, цветков зверобоя, листьев толокнянки и подорожника. Выявлена высокая антимикробная активность экстрактов рогов и эндокарпиев плодов водяного ореха. Причем при использовании в качестве экстрагента гексана антимикробная активность экстрактов рогов и эндокарпиев плодов *T. sibirica* была сравнима с активностью такого сильного антибиотика, как цефотаксим. Из луковиц чеснока и лука антимикробные метаболиты выделялись лишь при использовании гексана. Аптечные «травы» (можжевельник, зверобой, толокнянка и подорожник) показали наибольшую активность при спиртовой экстракции. Из всех проанализированных растений наибольшая активность и универсальность была характерна для экстрактов эндокарпиев водяного ореха и листьев толокнянки.

**Ключевые слова:** *Trapasibirica*, экстракт, антимикробная активность.

E. Sh. Zulkarnaeva, K. A. Farhutdinova, I. A. Yanturina

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AQUEOUS, ALCOHOLIC AND HEXANE EXTRACTS  
OF *TRAPA SIBIRICA* AND OTHER PLANT SPECIES**

Scientific Advisor – Professor Kuluev B.R.

BashkirStateMedicalUniversity

Institute of Biochemistry and Genetics of RAS

**Abstract.** Water, alcohol and hexane extracts of the *Trapa sibirica* water caltrop, garlic and onion bulbs, juniper fruits, tutsan flowers, bearberry and fleawort leaves were obtained. High antimicrobial activity of extracts of horns and endocarps of fruits of water caltrop has been revealed. When using hexane as an extractant, the antimicrobial activity of horns and endocarps extracts of *T. sibirica* fruits was comparable to the activity of such a strong antibiotic as cefotaxime. From bulbs of garlic and onion, antimicrobial metabolites were released only when using hexane. Pharmacy "herbs" (juniper, tutsan, bearberry, fleawort) showed the greatest activity with alcohol extraction. Of all the plants analyzed, the highest activity and versatility were characteristic for extracts of water caltrop endocarps

and bearberry leaves. When using ethyl alcohol as an extractant, a greater number of sensitive microorganisms were detected.

**Keywords:** *Trapa sibirica*, extract, antimicrobial activity.

**Актуальность.** Растения с антимикробной активностью в современной медицине рассматриваются в качестве одной из перспективных альтернатив антибиотикам, получаемым из микроорганизмов. Большое количество проводимых в этом направлении исследований говорит о возрастающей актуальности получения таких антимикробных метаболитов из растительных объектов. К примеру, на мышах было показано антибактериальное действие сухого экстракта ортилии однобокой (*Orthilia secunda*) (Ботоева, Убеева, 2010). На основе экстрактов сусака зонтичного (*Bútomus umbellátus*) и сальвинии плавающей (*Salvinia natans*) были проведены опыты по изучению их антимикробной активности по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям (Али-Эльдин, Егоров, 2011 г). Установлено что каланхоэ Дергамона (*Kalanchoe daigremontiana*) имеет противогрибковое, противолейшманиозное, инсектицидное действие (Анисимов и др., 2009). Была также показана высокая антисептическая активность эфирного масла и спиртовых экстрактов аира болотного (*Acorus calamus*) и верблюжьей колючки (*Alhagi pseudalhagi*) (Абдул-Хафиз и др., 2011). Были также проверены антибактериальные свойства экстрактов бадана (*Bergenia crassifolia*) и пятилистика (*Pentaphilloides fruticosa*) (Быкова и др., 2012). При определении антибактериальной активности экстрактов очитка большого (*Sedum maximum*) и очитка пурпурного (*Sedum telephium*) установлен бактериостатический эффект в отношении *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* (Дурнова, 2016). Ранее нами была выявлена относительно высокая антибактериальная активность спиртового экстракта эндокарпиев плодов водяного ореха *Trapa sibirica* (Кулуев и др., 2018). Для выделения из растительных тканей метаболитов с антимикробной активностью могут быть использованы полярные растворители, такие как вода и этиловый спирт, а также неполярные растворители, к примеру, гексан. При этом экстрагироваться могут разные вещества. Поэтому целью следующей нашей работы стало определение антимикробной активности водных, спиртовых и гексановых экстрактов разных частей плодов водяного ореха, луковиц чеснока и лука, а также аптечных сухих препаратов плодов можжевельника, цветков зверобоя, листьев толокнянки и подорожника, которые традиционно используются в медицине в качестве антибактериальных средств.

**Материалы и методы.** В эксперименте использовали следующие лекарственные растения в виде сухих трав: можжевельника плоды, толокнянка, зверобой, подорожник, которые были куплены в аптеке в городе Уфа. Для сравнительного анализа использовали экстракты луковиц чеснока *Allium sativum* и лука репчатого *Allium cepa*. Также использовали плоды водяного ореха *Trapa sibirica*, которые разделяли на ядро и оболочки: эндокарпий,

мезокарпий и экзокарпий. Растительные ткани были заморожены при  $-70^{\circ}$  в течение 1 часа, затем они подвергались гомогенизации в ступке с пестиком. Экстракцию метаболитов из этого порошка проводили отдельно в 70% этаноле, гексане и воде при комнатной температуре в течение 1,5 часов. После этого экстракты оставляли на 2 часа при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ . Затем экстракты нагревали 1 час до  $37^{\circ}\text{C}$  и центрифугировали 20 минут при 12 000 об./мин. Надосадочную жидкость (готовый экстракт) использовали в дальнейшем эксперименте. Культивировали микроорганизмы вида *E. coli* на среде LB. В работе использовали *E. coli* штамма XL1-Blue из коллекции ИБГ УФИЦ РАН и *E. coli* из коллекции клинической больницы №8 г. Уфы. Микроорганизмы *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* выращивали на среде Мюллера-Хинтона. Также в нашем эксперименте использовались микроорганизмы *Streptococcus mitis*, которые культивировались на кровяном агаре в анаэробных условиях. Антибиотикочувствительность определяли стандартизированным методом Кирби-Бауэра. Бумажные диски пропитывались экстрактом кожуры и ядер водяного ореха, лука и чеснока, и трав, купленных в аптеке, в течение 30 минут. В качестве положительного контроля использовали диски с антибиотиком цефотаксимом. Затем диски помещались на поверхность инокулированного агара, с последующей инкубацией в течение суток при  $37^{\circ}\text{C}$ . Антимикробная активность оценивалась по среднеарифметическому значению диаметра зон задержки роста (мм).

*Результаты и обсуждение.* Из водных экстрактов разных частей плодов водяного ореха наибольшая антимикробная активность была выявлена в эндокарпиях и рогах. К водному экстракту эндокарпиев плодов водяного ореха оказались чувствительными *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans*. *S. mitis* такой чувствительности не проявил. Водные экстракты луковиц чеснока и лука антимикробной активности не проявили. Экстракт плодов можжевельника проявил активность лишь на *S. mitis*, тогда как экстракт зверобоя оказался эффективным и в случае с *E. coli*. Экстракт толокнянки оказался активным против всех исследуемых бактерий, кроме кишечной палочки. Водный экстракт подорожника проявил активность лишь по отношению к *C. albicans*. В целом наибольшая антимикробная активность была характерна для водных экстрактов толокнянки и эндокарпиев водяного ореха, хотя их активность и была меньше почти в 2 раза, чем при использовании антибиотика цефотаксима. Диаметр зоны задержки роста при использовании цефотаксима составил в среднем 30 мм.

Спиртовой экстракт рогов и эндокарпиев плодов водяного ореха проявил антимикробную активность ко всем анализируемым микроорганизмам, кроме *S. mitis*. Экстракт мезокарпиев и ядер плодов водяного ореха такой антимикробной активности не проявлял. Спиртовые экстракты луковиц чеснока и лука, также как и водные экстракты антимикробной активностью не отличились. Экстракт плодов можжевельника был активен по отношению к *S.*

*aureus* и *S. mitis*, а экстракт зверобоя по отношению ко всем анализируемым микроорганизмам, кроме *S. mitis*. Наиболее интересные результаты показал спиртовой экстракт толокнянки, чувствительными к нему оказались все анализируемые микроорганизмы. Спиртовой экстракт подорожника был активен по отношению к *S. mitis* и *C. albicans*. Наибольшая степень антимикробной активности была зафиксирована для спиртовых экстрактов рогов и эндокарпиев водяного ореха, а также листьев толокнянки. Однако следует сказать, что активность цефотаксима была примерно в 2 раза выше, чем у этих растительных экстрактов.

Наибольшая антибактериальная активность была зафиксирована для гексановых экстрактов рогов и эндокарпиев плодов водяного ореха. Причем антимикробная активность этих экстрактов была вполне сравнимой с антибиотиком цефотаксимом. Необходимо отметить, что при гексановой экстракции антимикробные метаболиты выделялись также и из мезокарпиев водяного ореха. Гексановый экстракт ядер плодов водяного ореха антимикробной активности не показал. Очень высокий уровень антимикробной активности также показали гексановые экстракты лукович чеснока и лука (рис. 1). В то же время гексановые экстракты плодов можжевельника, листьев толокнянки и подорожника, цветков зверобоя не показали столь высокого уровня активности. Лишь *S. mitis* оказался чувствительным к гексановым экстрактам плодов можжевельника и листьев толокнянки.

*Выводы.* Таким образом, нами было показано, что в эндокарпиях плодов водяного ореха *T. sibirica* содержатся метаболиты с высокой антимикробной активностью. Исходя из того, что эти метаболиты лучше всего экстрагируются при помощи неполярного растворителя гексана, можно делать предположения о химической природе этих соединений. Однако нельзя исключать того, что эндокарпии плодов водяного ореха содержат несколько разных метаболитов с антимикробной активностью. В народной медицине в качестве антимикробного средства часто используют лук и чеснок, однако нами было показано, что водные экстракты лукович этих растений антимикробной активностью не обладают. В научной медицине в качестве антимикробных «трав» используют можжевельник, зверобой, толокнянку, подорожник и др. Нами было показано, что спиртовые экстракты этих растений действительно могут быть эффективными против ряда микроорганизмов. Из водных экстрактов наибольшей универсальностью характеризовался экстракт толокнянки.



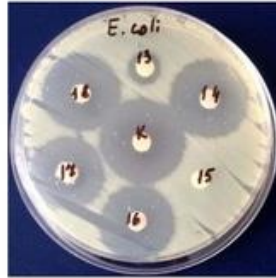


Рис. 1. Определение антибактериальной активности гексановых экстрактов на примере *E. coli* из коллекции больницы №8 г. Уфы. К – цефотаксим (контроль); 13 – мезокарпий плодов *T. sibirica*; 14 – эндокарпий плодов *T. sibirica*; 15 – ядра плодов *T. sibirica*; 16 – рога плодов *T. sibirica*; 17 – лук; 18 – чеснок.

#### Список литературы.

- Абдул-Хафиз И.Й., Егоров М.А., Сухенко Л.Т. Антибактериальная активность эфирного масла и спиртовых экстрактов аира болотного (*Acorus calamus*) и верблюжьей колючки (*Alhagi pseudalhagi*) собранных в Астраханской области // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2011. Т. 77. № 3. С. 50-53.
- Али-Эльдин А.М., Егоров М.А. Оценка антибактериальных эффектов экстрактов, полученных из сусака зонтичного. Естественные науки. 2011. №1. С. 77–80.
- Анисимов М.М., Герасименко Н.И., Чайкина Е.Л., Серебряков Ю.М. Биологическая активность метаболитов лекарственного растения Каланхоэ Дергамона (*Kalanchoe daigremontiana*) // Известия РАН серия Биологическая. 2009. №6. С. 669–676.
- Ботоева Е.А., Убеева И.П. Оценка фармакологических свойств сухого экстракта ортилии однобокой // Бюллетень ВСЦН СО РАМН. 2010. Т.72. №2. С. 16-170.
- Быкова А.С., Цыдендамбаев П.Б., Мищенко М.Н., Максименя М.В. Антибактериальные свойства экстрактов Бадана (*Bergenia crassifolia* Fr.) и Пятилистника (*Pentaphilloides fruticosa* L.) в терапии воспалительных заболеваний пародонта // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2012. №1. С. 21.
- Дурнова Н.А. Антибактериальная активность экстрактов очитка большого (*Sedum maximum* (L.) Hoffm.) и очитка пурпурного (*Sedum telephium*). Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2016. Том 6. № 5. С. 917.
- Кулуев Б.Р., Зилькарнаева Е.Ш., Артюхин А.Е., Михайлова Е.В. Антибактериальная активность спиртового экстракта эндокарпиев водяного ореха *Trapa sibirica* Fler. // Экобиотех. 2018. Т.1. №.1. С. 45-51.



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

*Зулькарнаева Е. Ш., Фархутдинова К. А., Антурсина У. А.*

ЗА ЛУЧШИЙ УСТНЫЙ ДОКЛАД СРЕДИ СТУДЕНТОВ

НА СЕКЦИИ

*«Биология, микробиология, физика»*  
НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ *д.б.н., профессор Б.Р. Кулиев*

83-Й ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

СТУДЕНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

«ВОПРОСЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ПРАКТИЧЕСКОЙ  
МЕДИЦИНЫ»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ

В.Н.Павлов





ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНГРЕСС  
БОТКИНСКИЕ ЧТЕНИЯ

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

21-22 МАЯ 2018 ГОДА  
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ



ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИКРОГЕМОЦИРКУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ С НЕАЛКОГОЛЬНЫМ СТЕАТОГЕПАТИТОМ ВСЛЕДСТВИЕ ПРЕНЕСЕННОГО ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА Хабарова А.В., Соцкая Я.А.	401
ПРЕКАНЦЕРОЗЫ КОЖИ – АНАЛИЗ ВЕРОЯТНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ Хаббус А.Г., Ключарева С.В., Гусева С.Н., Пирятинская В.А., Карякина Л.А.	402
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ИВЕРМЕКТИНА И ПЕРМЕТРИНА У БОЛЬНЫХ ЧЕСОТКОЙ И ДЕМОДЕКОЗОМ Хамидов Ф.Ш., Исмаилова З.Ф., Сатимов А.И., Насриддинова Н., Фозилов Ф.	403
КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ПОСТТРОМБОФЛЕБИТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ С НАЛИЧИЕМ ИЛИ ОТСУТСТВИЕМ РЕЦИДИВА ТРОМБОЗА Харченко Е.С., Мамаев А.Н., Берстенникова Т.Н.	405
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ФРАКЦИОННОГО ФОТОТЕРМОЛИЗА В ТЕРАПИИ КОЛЬЦЕВИДНОЙ ГРАНУЛЕМЫ Харчилава М.Г., Плахов В.Н., Хайрутдинов В.Р., Пономаренко Г.Н., Белоусова И.Э., Самцов А.В.	406
СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДЕТЕКЦИИ ACINETOBACTER SPP Хасанова Г.Ф., Орлова Г.В., Закирова Г.Н., Янтурина И.А., Мавзютов А.Р.	407
ХАРАКТЕРИСТИКА СУДОРОЖНЫХ СИНДРОМОВ У ДЕТЕЙ ЖИВУВЩИХ В ПРИАРАЛЬЕ Ходжанова Т.Р., Киличев И.А.	408
ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ОСТЕОАРТРОЗА Холиков О.Х., Ташпулатова М.М.	409



<p>ДИАГНОСТИКА ПОРАЖЕНИЯ СЕРДЦА У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ Юнусова Ш.Ш., Джураева Э.Р., Бердиева Д.У.</p>	451
<p>ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНАЦИИ СОВРЕМЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ РЕМАКСОЛ И ГЕПАТОСАН Якимович С.Е., Соцкая Я.А.</p>	452
<p>ИЗУЧЕНИЕ ЧАСТОТЫ И СТРУКТУРЫ ПРЕДМЕНСТРУАЛЬНОГО СИНДРОМА У ЖЕНЩИН ДЕТОРОДНОГО ВОЗРАСТА Якуббекова М.К., Ибрагимова З.А., Расулов Ж.М.</p>	453
<p>ПРОЯВЛЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У БОЛЬНЫХ С ОЖИРЕНИЕМ Ямщикова Т.Ю., Самсонова Т.И., Грачева Е.В., Шварцман З.Д., Макарова О.В.</p>	454
<p>СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДЕТЕКЦИИ P. AERUGINOSA Янтурина И.А., Хасанова Г.Ф., Гарипова З.Р., Мавзютов А.Р.</p>	456
<p>ДИАРЕЯ, АССОЦИИРОВАННАЯ С CLOSTRIDIUM DIFFICILE, У ПАЦИЕНТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО КЛИНИКИ МНОГОПРОФИЛЬНОГО СТАЦИОНАРА Ярушина Я.Н., Колотова Г.Б., Руднов В.А., Багин В.А.</p>	457



Все пациенты, получавшие терапию, находились под наблюдением в течение 12 месяцев. За указанный период времени у 2/18 наблюдалось появление единичных элементов кольцевидной гранулемы на коже.

**Выводы.** Проведенное исследование показало высокую эффективность фракционного фототермолиза в лечении больных кольцевидной гранулемой. Данный метод может быть рекомендован для лечения распространенных форм кольцевидной гранулемы.

### СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДЕТЕКЦИИ ACINETOBACTER SPP

Хасанова Г.Ф., Орлова Г.В., Закирова Г.Н., Янтурина И.А., Мавзютов А.Р.  
Башкирский государственный медицинский университет,  
г. Уфа

С каждым годом увеличивается количество грамотрицательных неферментирующих бактерий в структуре пейзажа микроорганизмов клинических стационаров. Наиболее изучен среди них *P. aeruginosa*. Однако, в последнее время при инфекционных процессах различной локализации, нередко отмечаются представители рода *Acinetobacter*. Актуальность этой проблемы заключается в том, что не всегда удается выделить этиологический значимый микроорганизм и существует необходимость начала терапии до получения результата бактериологического исследования.

**Цель работы** состояла в сравнении способов масс-спектрометрической идентификации и молекулярной детекции чистых культур для обнаружения представителей рода *Acinetobacter spp.*

**Материалы и методы.** Чистые культуры исследовали масс-спектрометрическим методом. Идентификацию бактерий проводили на масс-спектрометре фирмы bioMérieux, Франция. ДНК из образцов чистых культур выделяли набором для выделения ДНК из клинических образцов «Лизирующий раствор» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Был проведен анализ нуклеотидных последовательностей ДНК исследуемых микроорганизмов в международном банке нуклеотидных последовательностей EMBL/GenBank/DBJ. Подбор олигонуклеотидных праймеров к специфическим консервативным последовательностям ДНК проводился при использовании программы primer-select, *Acinetobacter spp.* к генам островов патогенности. Для сравнительной характеристики разработанных праймеров использовали программу Meg-Align. Проверка на специфичность и чувствительность данных праймеров выполнялась с помощью ПЦР по конечной точке. Внутренний контроль качества проводили параллельным тестированием контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Результаты и обсуждение.** При масс-спектрометрическом анализе чистых культур было выделено 28 штаммов *Acinetobacter spp.* Все штаммы определенные как *Acinetobacter spp.*, были дополнительно исследованы с помощью коммерческих тест-систем на микробиологическом анализаторе Vitec II Compact фирмы



bioMérieux, Франция. При молекулярной детекции этих штаммов с подобранными нами праймерами положительный результат был получен в 24 случаях. Для выявления специфичности подобранные праймеры были проверены на чистых культурах других возбудителей, где они показали отрицательный результат.

**Выводы.** Молекулярно-генетический и масс-спектрометрический методы имеют свои преимущества и недостатки, но являются одинаково эффективными технологиями в лабораторной практике. Сочетание метода MALDI-TOF MS и различных модификаций ПЦР поднимет на новый уровень микробиологическую диагностику инфекционных заболеваний.

### ХАРАКТЕРИСТИКА СУДОРОЖНЫХ СИНДРОМОВ У ДЕТЕЙ ЖИВУЩИХ В ПРИАРАЛЬЕ

Ходжанова Т.Р., Килгичев И.А.

Ургенчский филиал Ташкентской медицинской академии,  
г. Ургенч, Республика Узбекистан

**Цель исследования.** Анализ структуры и эффективности лечения эпилептических припадков у детей живущих в неблагоприятных условиях на территории Аральского моря.

**Материал и методы.** Были исследованы истории болезни 70 больных в возрасте от 1 до 14 лет, лечившихся в неврологическом отделении Хорезмского Областного детского многопрофильного медицинского центра.

**Результаты и обсуждение.** При исследовании причин болезни обнаружено что у родителей 22 (31%) больных были похожие припадки. Выявлено, что в 44 (63%) случаях причинами возникновения припадков были различные заболевания. Среди них, у 17 (37%) больных обнаружено ММД, у 11 (24%) различные неврологические заболевания (ДЦП, менингоэнцефалит, травмы головного мозга итд.) у 15 (33%) фебрильные судороги и у 3 (6%) выявлена гипокальциемия, а у остальных 4 (6%) больных причины возникновения болезни не выявлены. При анализе припадков по характеру у наблюдавшихся больных обнаружено, что у 65 (93%) диффузные, а у 5 (7%) очаговые припадки. У 60 (80%) больных с диффузными припадками обнаружены большие припадки, а у 5 (7%) малые припадки. У 3 (4%) больных с очаговыми припадками наблюдалась вторичная генерализованность. При анализе видов больших припадков выявлено что 81% в основном в виде тонико-клонических, а остальные 19% в виде тонических припадков. При исследовании эффективности методов лечения проведенных у больных, выяснилось что 45% из них принимали вольпроатовую кислоту, 30% карбамазепина, 22% бензонала и 3% фенобарбитала. Следует подчеркнуть, что 12% больных принимали комбинацию двух видов антиконвульсантов. В результате проведенных лечебных мероприятий было достигнуто прекращение припадков у 46% и умень-



## СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДЕТЕКЦИИ *P. AERUGINOSA*

Янгурина И.А., Хасанова Г.Ф., Гарипова З.Р., Мавзютов А.Р.  
Башкирский государственный медицинский университет,  
г. Уфа

С каждым годом увеличивается количество грамотрицательных неферментирующих бактерий в структуре пейзажа микроорганизмов клинических стационаров. Наиболее изучен среди них *P. aeruginosa*. Актуальность этой проблемы заключается в том, что существует необходимость начала терапии до получения результата бактериологического исследования.

**Цель работы** состояла в сравнении способов масс-спектрометрической идентификации и молекулярной детекции чистых культур для обнаружения представителей *P. aeruginosa*.

**Материалы и методы.** Чистые культуры исследовали масс-спектрометрическим методом. Идентификацию бактерий проводили на масс-спектрометре фирмы bioMérieux, Франция. ДНК из образцов чистых культур выделяли набором для выделения ДНК из клинических образцов «Лизирующий раствор» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Был проведен анализ нуклеотидных последовательностей ДНК исследуемых микроорганизмов в международном банке нуклеотидных последовательностей EMBL/GenBank/DDBJ. Подбор олигонуклеотидных праймеров к специфическим консервативным последовательностям ДНК проводился при использовании программы primer-select, *P. aeruginosa* к генам островков патогенности. Для сравнительной характеристики разработанных праймеров использовали программу Meg-Align. Проверка на специфичность и чувствительность данных праймеров выполнялась с помощью ПЦР по конечной точке. Внутренний контроль качества проводили параллельным тестированием контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Результаты и обсуждение.** При масс-спектрометрическом анализе чистых культур было выделено 37 штаммов *P. aeruginosa*. Все штаммы, определенные как *P. aeruginosa*, были дополнительно исследованы с помощью коммерческих тест-систем на микробиологическом анализаторе Vitec II Compact фирмы bioMérieux, Франция. При молекулярной детекции этих штаммов с подобранными нами праймерами положительный результат был получен в 32 случаях. Для выявления специфичности, подобранные праймеры были проверены на чистых культурах других возбудителей, где они показали отрицательный результат.

**Выводы.** Молекулярно-генетический и масс-спектрометрический методы имеют свои преимущества и недостатки, но являются одинаково эффективными технологиями в лабораторной практике. Сочетание метода MALDI-TOF MS и различных модификаций ПЦР поднимет на новый уровень микробиологическую диагностику инфекционных заболеваний.



# Сертификат

*Янтурина Ирина Альбертовна*

принял(а) участие в работе школы-семинара

**HTSDD-2018**  
**High throughput screening in drug discovery**

состоявшейся 13 июня 2018 г. в городе Уфа  
в рамках Государственного контракта РФ "Новый рациональный  
подход к разработке антибактериальных и противоопухолевых  
лекарственных молекул с применением технологии ВПС"

Председатель программного комитета  
к.б.н. Иваненков Ян Андреевич





**АНТИПЛАГИАТ**  
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Башкирский государственный  
медицинский университет

## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Янтурина Ирина Альбертовна
Факультет, кафедра, номер группы	Б - 401а
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА ТОХА ЭКЗОТОКСИНА PSEUDOMONAS AERUGINOSA И ГЕНА PMEN_4277 СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ MVIN PSEUDOMONAS MENDOCINA
Название файла	ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА ТОХА ЭКЗОТОКСИНА PSEUDOMONAS AERUGINOSA И ГЕНА PMEN_4277 СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ MVIN PSEUDOMONAS MENDOCINA.docx
Процент заимствования	12,64%
Процент цитирования	0,58%
Процент оригинальности	86,78%
Дата проверки	16:16:26 22 июня 2018г.
Модули поиска	Модуль поиска перефразирований Интернет; Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС; Модуль выделения библиографических записей; Модуль поиска "БГМУ"
Работу проверил	Кобзева Наталья Рудольфовна ФИО проверяющего
Дата подписи	25.06.2018

ФГБОУ ВО БГМУ  
Минздрава России  
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Чтобы убедиться  
в подлинности справки,  
используйте QR-код, который  
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование  
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.  
Предоставленная информация не подлежит использованию  
в коммерческих целях.

## ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Янтурина Ирина Альбертовна выполнила выпускную квалификационную работу на тему «ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА *toxA* ЭКЗОТОКСИНА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И ГЕНА *pmen\_4277* СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ *MVIN PSEUDOMONAS MENDOCINA*».

Представленная работа посвящена проблеме разработки новых подходов к оценке этиологической значимости неферментирующих грамотрицательных бактерий, часто выявляемых от больных с гнойно-воспалительными процессами различной локализации. Традиционные способы оценки этиологической значимости условно-патогенных бактерий применительно к неферментирующим бактериям отличает низкая воспроизводимость и недостаточная информативность ввиду слабой выраженности и вариабельности учитываемых при этом фенотипических признаков. В этой связи перспективной представляется цель данной ВКР - использование в качестве маркеров патогенности гена *toxA* экзотоксина для *Pseudomonas aeruginosa* и гена *pmen\_4277* – для *Pseudomonas mendocina*.

За время обучения в БГМУ Янтурина И.А. освоила учебную программу в полном объеме. Все годы училась только на «хорошо» и «отлично», совмещая учебу с научной работой в студенческом научном кружке.

В процессе выполнения ВКР Янтурина И.А. уверенно овладела навыками работы с микроорганизмами, включая неферментирующие грамотрицательные условно-патогенные бактерии. Освоила приемы их идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и исследования методом ПЦР. Полученные в ходе выполнения результаты были апробированы, представлены в публикациях и в виде устных сообщений на конференциях, включая международные (БГМУ-2018 и др.).

В ходе выполнения ВКР Янтурина И.А. продемонстрировала навыки самостоятельной работы и компетенции, которыми должен обладать обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль – микробиология).

Таким образом, выпускная квалификационная работа Янтуриной И.А. ДОПУСКАЕТСЯ К ЗАЩИТЕ и рекомендуется для положительной оценки.

Научный руководитель:  
д.м.н., профессор, зав.кафедрой  
фундаментальной и прикладной  
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ  
Минздрава России



А.Р.Мавзютов

## ОТЗЫВ

внешнего рецензента доктора биологических наук Гималова Ф.Р. на выпускную квалификационную работу Янтуриной Ирины Альбертовны на тему «ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА *toxA* ЭКЗОТОКСИНА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И ГЕНА *rmen\_4277* СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ *MVIN PSEUDOMONAS MENDOCINA*».

Одной из наиболее сложных задач современной бактериологии является детекция и идентификация неферментирующих грамотрицательных бактерий. В связи с этим исключительно актуальной является цель данного исследования, в котором предполагается оценить эффективность использования ПЦР для идентификации гена *toxA* экзотоксина *Pseudomonas aeruginosa* и гена *rmen\_4277 Pseudomonas mendocina* и технологии времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF масс-спектрометрия) для идентификации *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas mendocina*, результаты которых дадут возможность клиническим врачам предупреждать распространение инфекций и возникновение осложнений, а также позволят вовремя назначить адекватную антибиотикотерапию.

В ходе проведения данного исследования автором были освоены все необходимые для решения этой задачи методы, включая ПЦР и MALDI-TOF масс-спектрометрию.

Структурно в работе представлены разделы введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, собственные данные и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности.

Таким образом, выпускная квалификационная работа Янтуриной Ирины Альбертовны на тему «ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА *toxA* ЭКЗОТОКСИНА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И ГЕНА *rmen\_4277* СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ *MVIN PSEUDOMONAS MENDOCINA*», выполненная под руководством зав. кафедрой ФПМ, доктора медицинских наук, профессора Мавзютова Айрата Радиковича является завершённой и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат), а соискатель заслуживает оценки «отлично».

Доктор биологических наук,  
Ученый секретарь  
Института биохимии и генетики  
УФИЦ РАН

Фуат Рамазанович Гималов

